

**Genom- und funktionelle Analysen zur Wirtsassoziation, Wirtsadaptation und Virulenz von *Klebsiella pneumoniae***

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften

der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer

Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Kathleen Klaper, geb. Fröhlke  
aus Potsdam

1. Referent:	Prof. Dr. Michael Steinert
2. Referent:	apl. Prof. Dr. Guido Werner
eingereicht am:	18.05.2021
mündliche Prüfung (Disputation) am:	02.09.2021

Druckjahr 2021

## Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

## Publikationen

**Klaper, K.; Hammerl A. J.; Rau, J.; Pfeifer, Y.; Werner, G.** Genome-based analysis of *Klebsiella* spp. isolates from animals and food products in Germany, 2013-2017. *Pathogens*, eingereicht

**Klaper, K.; Wendt, S.; Lubbert, C.; Lippmann, N.; Pfeifer, Y.; Werner, G.** Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* of Lineage ST66-K2 Caused Tonsillopharyngitis in a German Patient. *Microorganisms* **2021**, 9, doi:10.3390/microorganisms9010133.

**Haller, S.; Kramer, R.; Becker, K.; Bohnert, J. A.; Eckmanns, T.; Hans, J. B.; Hecht, J.; Heidecke, C. D.; Hübner, N.O.; Kramer, A.; Klaper, K., et al.** Extensively drug-resistant *Klebsiella pneumoniae* ST307 outbreak, north-eastern Germany, June to October 2019. *Euro Surveill* **2019**, 24, doi:10.2807/1560-7917.ES.2019.24.50.1900734.

## Posterbeiträge

**Klaper, K.; Heinrich, L.; Walter, S.; Gerlach, R.; Fuchs, S.; Pfeifer, Y.; Werner, G.** Genome-based analyses of *Klebsiella pneumoniae* to detect possible host-associations, host-adaptation and effects on virulence. Poster P111. 12<sup>th</sup> International Meeting on Microbial Epidemiological Markers (IMMEM XII). Dubrovnik. **(2019)**

**Klaper, K.; Heinrich, L.; Walter, S.; Gerlach, R.; Fuchs, S.; Pfeifer, Y.; Werner, G.** Functional characterization of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. Junior Scientist Zoonoses Meeting. Berlin. **(2019)**

# Inhaltsverzeichnis

Vorveröffentlichungen der Dissertation .....	i
Inhaltsverzeichnis .....	ii
Abkürzungsverzeichnis.....	vii
Abbildungsverzeichnis .....	viii
Tabellenverzeichnis .....	x
Zusammenfassung .....	xi
Summary .....	xiii
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1. <i>Klebsiella</i> .....	1
1.2. <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	1
1.3. Genomische Eigenschaften und Diversität von <i>K. pneumoniae</i> .....	2
1.4. <i>K. pneumoniae</i> Genotypisierung.....	2
1.4.1. Kapseltypisierung .....	3
1.4.2. Multilokus-Sequenztypisierung.....	3
1.5. Antibiotikaresistenzen in <i>K. pneumoniae</i> .....	4
1.6. Hypervirulente <i>K. pneumoniae</i> .....	6
1.6.1. Definition hypervirulenter <i>K. pneumoniae</i> .....	7
1.7. Virulenzfaktoren .....	9
1.7.1. Kapsel .....	9
1.7.2. Regulatoren des mukoiden Phänotyps A2 ( <i>rmpA/rmpA2</i> ) .....	9
1.7.3. Siderophore.....	10
1.7.4. Colibactin.....	11
1.8. <i>K. pneumoniae</i> Pathogenese.....	11
1.8.1. Kolonisation.....	11
1.8.2. Adhäsion.....	12
1.8.3. Invasion .....	13
1.8.4. Serum- und Phagozytoseresistenz .....	14
1.9. Zoonotisches Potential von <i>K. pneumoniae</i> .....	15
1.10. Zielstellung dieser Arbeit.....	16

1.10.1. Genom-basierte Analysen von Tier- und Lebensmittel-assoziierten <i>Klebsiella</i> spp.-Isolaten aus Deutschland .....	16
1.10.2. Genom-basierte Analysen von hypervirulenten <i>K. pneumoniae</i> -Isolaten aus Deutschland .....	16
1.10.3. Funktionelle Analysen von <i>K. pneumoniae</i> zur Erfassung einer möglichen Wirtsassoziation, Wirtsadaption und Auswirkungen auf die Virulenz und Antibiotikaresistenz.....	17
1.10.4. Generierung und Charakterisierung einer <i>rmpA</i> -Deletionsmutante.....	17
<b>2. Material und Methoden.....</b>	<b>19</b>
2.1. Chemikalien .....	19
2.2. Enzyme .....	20
2.3. Geräte.....	20
2.4. Kits .....	21
2.5. Lösungen und Puffer .....	22
2.6. Materialien .....	22
2.7. Medien .....	23
2.8. Plasmide .....	24
2.9. Primer .....	24
2.10. Software .....	25
2.11. Methoden.....	26
2.11.1. Kultivierung von <i>K. pneumoniae</i> .....	26
2.11.2. Kultivierung von <i>E. coli</i> .....	26
2.11.3. Kryokonservierung .....	27
2.11.4. Phänotypische Resistenztestung.....	27
2.11.5. Lichtmikroskopie .....	28
2.11.6. Anzucht von Zellkulturen .....	28
2.11.7. Molekularbiologische Arbeiten.....	29
2.11.7.1. DNA-Isolierung .....	29
2.11.7.2. Koch-DNA .....	29
2.11.7.3. DNeasy Blood & Tissue Kit.....	29
2.11.7.4. MagAttract HMW DNA Kit.....	29
2.11.7.5. NucleoSpin Gel and PCR Clean-up.....	29
2.11.7.6. Plasmid-Isolation .....	30

2.11.8. DNA-Techniken.....	30
2.11.8.1. Polymerase Kettenreaktion (PCR) .....	30
2.11.8.2. DNA-Qualitäts- und DNA-Konzentrationsbestimmung.....	31
2.11.8.3. DNA-Restriktionsverdau .....	31
2.11.8.4. Ligation .....	31
2.11.8.5. Gibson Assembly .....	31
2.11.8.6. Agarose-Gelelektrophorese .....	32
2.11.9. Sequenziermethoden .....	32
2.11.9.1. Sanger-Sequenzierung.....	32
2.11.9.2. Illumina Ganzgenomsequenzierung.....	32
2.11.9.3. Nanopore MinION Ganzgenomsequenzierung .....	32
2.11.10. Bioinformatik.....	33
2.11.10.1. Qualitätskontrolle von Rohdaten .....	33
2.11.10.2. De novo Assemblierung.....	33
2.11.10.3. Rekonstruktion der Plasmidsequenzen des <i>K. pneumoniae</i> -Isolats 17-0005 .....	33
2.11.10.4. Mapping und SNP-Identifizierung von ST66-K2 <i>K. pneumoniae</i> -Isolaten .....	34
2.11.10.5. Berechnung und Visualisierung SNP-basierter Phylogenien.....	34
2.11.10.6. Genotypisierung anhand von Ganzgenomdaten .....	34
2.11.10.6.1. Multilokus-Sequenztypisierung ( <i>multilocus sequence typing</i> = MLST) .....	34
2.11.10.6.2. Kerngenom-Multilokus-Sequenztypisierung (cgMLST).....	35
2.11.10.6.3. cgMLST-basierte Phylogenien .....	35
2.11.11. Herstellung und Transformation kompetenter <i>K. pneumoniae</i> und <i>E. coli</i> ..	35
2.11.11.1. Herstellung chemisch-kompetenter <i>E. coli</i> .....	35
2.11.11.2. Herstellung elektro-kompetenter <i>K. pneumoniae</i> .....	35
2.11.12. Transformation von DNA .....	36
2.11.12.1. Hitzeschock Transformation.....	36
2.11.12.2. Elektroporation .....	36
2.11.12.3. Markerfreie chromosomale Deletionen.....	37
2.12. Zellinfektionsversuche.....	37

2.12.1. Adhäsionsassay .....	38
2.12.2. Invasionsassay .....	38
2.12.3. Replikationsassay .....	38
2.12.4. Zytotoxizitätsassay .....	39
2.12.5. Wachstumsverhalten in Thrombozytenkonzentraten .....	39
2.12.6. Serumresistenz .....	39
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>41</b>
3.1. Genom-basierte Analysen von Tier- und Lebensmittel-assoziierten <i>Klebsiella</i> spp.- Isolaten aus Deutschland .....	41
3.1.1. Identifizierung der <i>Klebsiella</i> spp.-Isolate .....	41
3.1.2. Resistenz und Nachweis von Antibiotikaresistenzgenen .....	42
3.1.3. Kapsel-Typisierung .....	44
3.1.4. Nachweis von Virulenzgenen und Virulenzplasmiden .....	45
3.1.5. Phylogenie von <i>K. pneumoniae</i> Spezies Komplex Isolaten .....	45
3.2. Population von hvKp-Isolaten in Deutschland .....	49
3.2.1. Auswahl von hvKp-Isolaten .....	49
3.2.2. Antibiotikaresistenzen und Nachweis von Antibiotikaresistenzgenen in 22 hvKp-Isolaten.....	49
3.2.3. MLST- und Kapsel-Typisierung von hvKp-Isolaten aus Deutschland .....	50
3.2.4. Nachweis von Virulenzgenen in 22 hvKp .....	51
3.2.5. Populationsstruktur von hvKp-Isolaten in Deutschland .....	52
3.3. Hypervirulente <i>K. pneumoniae</i> Linie ST66-K2 .....	54
3.3.1. Genotypisierung .....	55
3.3.2. Phylogenie .....	55
3.3.3. Plasmidrekonstruktion und Sequenzvergleich .....	56
3.4. Funktionelle Analysen von <i>K. pneumoniae</i> zur Erfassung einer möglichen Wirtsassoziation, Wirtsadaption und Auswirkungen auf die Virulenz sowie Antibiotikaresistenz.....	57
3.4.1. Zellmorphologische Unterschiede klinischer <i>K. pneumoniae</i> -Isolate.....	57
3.4.2. Zellmorphologische Veränderungen von <i>K. pneumoniae</i> unter Sauerstoffreduktion .....	58
3.4.3. Zellinfektionsexperimente .....	60

3.4.3.1.	Vergleich des <i>in vitro</i> Adhäsionsverhalten von klinischen <i>K. pneumoniae</i> -Isolaten.....	60
3.4.3.2.	Vergleich der zellulären Invasion <i>in vitro</i> von klinischen <i>K. pneumoniae</i> -Isolaten .....	61
3.4.3.3.	Untersuchung des Einflusses von ESBL-Gen-tragenden Plasmiden auf nicht-invasive <i>E. coli</i> .....	62
3.4.3.4.	Vergleich der <i>in vitro</i> Phagozytose von klinischen <i>K. pneumoniae</i> -Isolaten .....	63
3.4.3.5.	<i>In vitro</i> Vergleiche intrazellulärer Replikation von klinischen <i>K. pneumoniae</i> -Isolaten unter Normoxie und Hypoxie.....	65
3.4.3.6.	<i>In vitro</i> Vergleich intrazellulärer Replikation human- und veterinär-pathogener <i>K. pneumoniae</i> -Isolate .....	66
3.4.3.7.	Vergleich zytotoxischer Effekte von klinischen <i>K. pneumoniae</i> -Isolaten .....	67
3.4.4.	Wachstum in Thrombozytenkonzentraten .....	68
3.4.5.	Serumresistenz von klinischen <i>K. pneumoniae</i> -Isolaten.....	69
3.5.	Charakterisierung einer <i>rmpA</i> -Deletionsmutante .....	71
<b>4.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>74</b>
4.1.	Genom-basierte Analysen von Tier- und Lebensmittel-assoziierten <i>Klebsiella</i> spp.-Isolaten aus Deutschland .....	74
4.2.	Genom-basierte Analysen von hypervirulenten <i>K. pneumoniae</i> -Isolaten (hvKp) aus Deutschland.....	76
4.3.	Hypervirulente <i>K. pneumoniae</i> Linie ST66-K2 .....	79
4.4.	Funktionelle Analysen von <i>K. pneumoniae</i> zur Erfassung einer möglichen Wirtsassoziation, Wirtsadaption und Auswirkungen auf die Virulenz und Antibiotikaresistenz.....	81
<b>5.</b>	<b>Ausblick .....</b>	<b>88</b>
<b>6.</b>	<b>Literatur.....</b>	<b>90</b>
<b>Anhang</b>	<b>.....</b>	<b>I</b>
<b>Danksagung</b>	<b>.....</b>	<b>X</b>



## Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
BHI	Brain-Heart-Infusion
<i>bla</i>	Beta-Laktamase-Gen
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp, kb	Basenpaare, Kilobasenpaare
CG	Klonale Gruppe (clonal group)
cKp	“classical” <i>K. pneumoniae</i>
<i>cps</i>	capsular polysaccharide synthesis
CVUA	Chemisches- und Veterinäruntersuchungsamt
ddH <sub>2</sub> O	bidestilliertes Wasser
dNTP	Didesoxyribonukleotide
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESBL	extended-spectrum beta-lactamase
ESBL-cKp	ESBL producing “classical” <i>K. pneumoniae</i>
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FLI	Friedrich-Löffler-Institut
HGT	horizontaler Gentransfer
hvKp	hypervirulente <i>Klebsiella pneumoniae</i>
Inc	Inkompatibilitätsgruppe (incompatibility group)
IS	Insertionssequenz (insertion sequence)
KpSC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Spezies Komplex (species complex)
LB	Luria Bertani
MH	Mueller-Hinton
MHK	Minimale Hemmkonzentration
MLST	Multilocus sequence typing
MRGN	Multiresistente Gram-negative Erreger
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NGS	Next-Generation-Sequencing
NRZ	Nationales Referenzzentrum
PCR	Polymerasekettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
s, min, h	Sekunde(n), Minute(n), Stunde(n)
SNP	single nucleotide polymorphism
ST	Sequenztyp (sequence type)
Upm	Umdrehungen pro Minute
WGS	whole genome sequencing

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Zeitachse der Antibiotikaresistenz-Entwicklung bei <i>K. pneumoniae</i> .....	4
Abbildung 2: Anteil (%) invasiver <i>K. pneumoniae</i> -Isolate mit Resistenz gegenüber (A) Cephalosporinen der 3. Generation und (B) Carbapenemen im Jahr 2019 im europäischen Vergleich.....	5
Abbildung 3: Positiver String-Test eines hypermukoviskösen <i>K. pneumoniae</i> -Isolates. ....	8
Abbildung 4: Schematischer Vergleich des Repertoires an Pathogenitätsfaktoren von cKp- und hvKp-Stämmen.....	10
Abbildung 5: Schematische Übersicht von 94 <i>Klebsiella</i> spp.-Isolaten aus Tieren und Lebensmittelprodukten aus Deutschland.....	42
Abbildung 6: Vergleich der <i>bla</i> <sub>SHV</sub> Promotorsequenzen. ....	44
Abbildung 7: Phylogenetischer Baum von 72 KpSC ( <i>K. pneumoniae</i> Spezies Komplex)-Isolaten aus Tieren und Lebensmitteln. ....	47
Abbildung 8: Genetisch verwandte Cluster von <i>K. pneumoniae</i> -Isolaten basierend auf cgMLST. ....	48
Abbildung 9: Phylogenetischer Baum von hvKp-Isolaten aus Deutschland und den. ....	52
Abbildung 10: Hypermukovisköser Phänotyp des <i>K. pneumoniae</i> -Isolates 18-0005. ....	54
Abbildung 11: Phylogenetische Analyse von ST66-K2 <i>K. pneumoniae</i> -Isolaten. ....	55
Abbildung 12: Vergleich der Plasmidsequenzen der hvKp-Stämme Kp52.145, SB5881 und 18-0005. ....	56
Abbildung 13: Zellmorphologische Unterschiede von cKp-, ESBL-cKp- und hvKp-Isolaten unter Normoxie. ....	58
Abbildung 14: Zellmorphologische Unterschiede von cKp-, ESBL-cKp- und hvKp-Isolaten unter Hypoxie. ....	59
Abbildung 15: Quantifizierung der Adhäsion von <i>K. pneumoniae</i> -Stämmen an A549- und HT29-MTX-Zellen.....	61
Abbildung 16: Quantifizierung der Invasion von <i>K. pneumoniae</i> -Stämmen in A549- und HuTu80-Zellen. ....	62
Abbildung 17: Quantifizierung der Invasion von <i>E. coli</i> -Stämmen in HuTu80-Zellen.....	63
Abbildung 18: Quantifizierung der Phagozytoseresistenz und der intrazellulären Replikation verschiedener <i>K. pneumoniae</i> -Pathotypen. ....	64
Abbildung 19: Vergleich der Replikation von klinischen <i>K. pneumoniae</i> -Isolaten in Raw 264.7-Mausermakrophagen unter Normoxie und Hypoxie.....	65
Abbildung 20: Vergleich der Replikation von human- und veterinär-pathogenen <i>K. pneumoniae</i> -Isolaten in Raw 264.7-Mausermakrophagen.....	66

Abbildung 21: Vergleich des zytotoxischen Effekts von <i>K. pneumoniae</i> auf HuTu80-Darmzellen. .....	67
Abbildung 22: Vergleich des Wachstumsverhaltens von <i>K. pneumoniae</i> -Isolaten in Thrombozytenkonzentraten.....	69
Abbildung 23: Vergleich der Serumresistenz von <i>K. pneumoniae</i> -Isolaten.....	69
Abbildung 24: Einfluss von <i>rmpA</i> auf die Zellmorphologie von <i>K. pneumoniae</i> .....	71
Abbildung 25: Einfluss von <i>rmpA</i> auf die Invasionsfähigkeit von <i>K. pneumoniae</i> in HuTu80- Darmzellen.....	72

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht verwendeter Chemikalien und deren Hersteller .....	19
Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Enzyme und deren Hersteller .....	20
Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Geräte und deren Hersteller .....	20
Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Kits.....	21
Tabelle 5: Übersicht der verwendeten Puffer und Lösungen .....	22
Tabelle 6: Übersicht der verwendeten Materialien und deren Hersteller .....	22
Tabelle 7: Übersicht der verwendeten Medien und deren Zusammensetzung .....	23
Tabelle 8: Übersicht der verwendeten Plasmide .....	24
Tabelle 9: Übersicht der verwendeten Primer.....	24
Tabelle 10: Übersicht der verwendeten Software .....	25
Tabelle 11: Übersicht der verwendeten <i>K. pneumoniae</i> - und <i>E. coli</i> -Stämme .....	27
Tabelle 12: Übersicht der verwendeten Zelllinien .....	28
Tabelle 13: Multiplex PCR Ansatz.....	30
Tabelle 14: Multiplex PCR-Bedingungen .....	31
Tabelle 15: Übersicht über die Kapseltypen und Resistenzgene von 94 untersuchten <i>Klebsiella</i> spp.-Isolaten .....	43
Tabelle 16: Übersicht der identifizierten Sequenztypen von 72 untersuchten KpSC-Isolaten.....	46
Tabelle 17: Übersicht über die im Rahmen der vorliegenden Arbeit sequenzierten 22 hvKp- Isolaten aus Deutschland mit den jeweiligen Beta-Laktamase kodierenden Genen .	50
Tabelle 18: Übersicht über die Sequenz- und Kapseltypen von 22 hvKp-Isolaten .....	50
Tabelle 19: Übersicht über die 22 hvKp-Isolate aus Deutschland mit den jeweiligen Virulenzfaktoren.....	51
Tabelle 20: Antibiogramm des <i>K. pneumoniae</i> -Isolates 18-0005 .....	54

## Zusammenfassung

*Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) spielt weltweit eine wichtige Rolle als opportunistischer Erreger von nosokomialen Infektionen. In den letzten Jahren wurde besonders die Zunahme von Antibiotikaresistenzen sowie Infektionen durch hypervirulente *K. pneumoniae* mit Sorge beobachtet. Die Tatsache, dass das Vorkommen von *K. pneumoniae* nicht nur auf den humanmedizinischen Bereich beschränkt ist, birgt ein Risiko für zoonotische Transmissionen und Reservoir für Antibiotikaresistenzen sowie Virulenzdeterminanten.

Die erste Teilstudie dieser Arbeit widmete sich daher der Untersuchung der *Klebsiella* spp. Population in Lebensmitteln und Tieren aus Deutschland. Um mögliche tierische Reservoir humanassoziierter, nosokomialer und hypervirulenter Stammvarianten zu identifizieren, wurden Ganzgenomsequenzen von *Klebsiella* spp.-Isolaten hinsichtlich des Sequenz- und Kapseltyps sowie dem Vorhandensein von Antibiotikaresistenzen und Virulenzgenen charakterisiert und phylogenetisch analysiert. Die Untersuchungen zeigten eine hohe Prävalenz der Spezies *K. pneumoniae*, welche eine hohe genetische Diversität aufwies. Darüber hinaus wurden die human-assoziierten Sequenztypen ST11 und ST147 in Schweine- bzw. Rindfleisch identifiziert. Als bedeutender Virulenzfaktor wurde das Siderophor Aerobactin (*iuc3*) in einer Vielzahl von *K. pneumoniae*-Isolaten aus Schweinen gefunden.

Die zweite Teilstudie in dieser Arbeit widmete sich der Identifizierung und Charakterisierung hypervirulenter *K. pneumoniae*-Isolate aus Deutschland. Dabei wurden neben den bekannten hypervirulenten Linien, wie ST5, ST23, ST66, ST380 und ST412, auch die bisher nur selten mit Hypervirulenz assoziierten Sequenztypen ST310 und ST2985 identifiziert. Zudem wurde bei einem Teil der Isolate Resistenz gegenüber Beta-Laktamen, verursacht durch Bildung von ESBL (*extended-spectrum beta-lactamase*) und Carbapenemasen, beobachtet. Weiterhin wurden weltweit erfolgreiche antibiotikaresistente Linien wie ST17, ST147, ST307, ST392 und ST395 nachgewiesen, welche zusätzlich Virulenzgene erworben hatten. Insgesamt zeigten die Daten, dass resistente und hypervirulente *K. pneumoniae* bereits ein ernstzunehmendes Problem in Deutschland darstellen.

In der dritten Teilstudie wurden die Pathogen-Wirts-Interaktionen von verschiedenen *K. pneumoniae*-Isolaten humanen und tierischen Ursprungs untersucht. *In vitro* Infektionsversuche mit einer Epithelzell- sowie einer Makrophagenzelllinie ergaben signifikante Unterschiede in Bezug auf die Invasionsfähigkeit, die Phagozytoseresistenz und das Replikationsvermögen zwischen den verschiedenen *K. pneumoniae*-Pathotypen. Die Resultate aus Untersuchungen des Wachstumsverhalten von *K. pneumoniae* in Thrombozyten und Serum zeigten, dass Siderophore keine essentiellen Faktoren für die Proliferation von *K. pneumoniae* in Blutkomponenten darstellen.

Im Rahmen des vierten Teilprojektes konnte gezeigt werden, dass der Transkriptionsregulator *rmpA* nicht nur die Synthese von Kapselpolysacchariden reguliert, sondern auch einen Einfluss auf die Zellmorphologie von *K. pneumoniae* ausübt. Darüber hinaus konnte in *in vitro* Infektionsexperimenten gezeigt werden, dass die Deletion von *rmpA* mit einer gesteigerten Invasion in Darmzellen einhergeht.

Zusammenfassend konnten durch die Kombination von Ganzgenomsequenz-basierten und experimentellen Daten neue Erkenntnisse über die Pathogen-Wirts-Interaktion zwischen Klebsiellen und ihren Wirten gewonnen werden, die zu einem besseren biologischen Verständnis von *K. pneumoniae* führen und wichtige Anknüpfungspunkte für zukünftige therapeutische Ansätze und experimentelle Forschungsthemen bieten.

## Summary

*Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) is one of the most important opportunistic pathogens causing nosocomial infections worldwide. In recent years, the increase in antibiotic resistance and infections caused by hypervirulent *K. pneumoniae* poses great concern. Given the occurrence of *K. pneumoniae* also in veterinary medicine presents a risk for zoonotic transmissions and animal reservoirs for antibiotic resistance and virulence determinants.

Therefore, the aim of this study was to investigate the molecular-genetic characteristics of *Klebsiella* spp. isolates from animal and food sources from Germany by conducting next-generation sequencing (NGS)-based analysis. Whole genome sequences of *Klebsiella* spp. isolates were characterized and phylogenetically analyzed with regard to sequence and capsule type and the presence of antibiotic resistance and virulence genes. The results showed a high prevalence of the species *K. pneumoniae*, displaying a high genetic diversity. In addition, two human-associated sequence types ST11 and ST147 were identified from pig and cattle, respectively. Furthermore, an important virulence factor, the siderophore aerobactin (*iuc3*), was identified in a large number of *K. pneumoniae* isolates from pigs.

The aim of the second part of this work was the identification and characterization of hypervirulent *K. pneumoniae* isolates from Germany. In addition to known hypervirulent lineages such as ST5, ST66, ST380 and ST412, the sequence types ST310 and ST2985 were identified, which were rarely associated with hypervirulence, yet. Furthermore, resistance to beta-lactams caused by production of extended-spectrum beta-lactamase and carbapenemases was observed in the hypervirulent isolates. Several globally successful antibiotic-resistant lines such as ST17, ST147, ST307, ST392 and ST395 were detected which have additionally acquired virulence genes.

In the third study, the pathogen-host interaction of different *K. pneumoniae* isolates of human and animal origin were analyzed. *In vitro* infection experiments with an epithelial and a macrophage cell line revealed significant differences in invasion ability, phagocytosis resistance and intracellular replication between different *K. pneumoniae* pathotypes. The results from investigations of the growth behavior of *K. pneumoniae* in platelets and serum show that

siderophores are not essential factors for the proliferation of *K. pneumoniae* in blood components.

In the fourth project, it was shown that the transcriptional regulator *rmpA* not only regulates the synthesis of capsular polysaccharides, but also exerts an influence on the cell morphology of *K. pneumoniae*. Furthermore, *in vitro* infection experiments showed that the deletion of *rmpA* is associated with an increased cell invasion.

In summary, the combination of NGS-based and experimental data provided new insights into the pathogen-host interaction of *K. pneumoniae* in different hosts, leading to a better understanding of the pathogenicity and providing novel aspects for future therapeutics and research studies.



# 1. Einleitung

## 1.1. *Klebsiella*

Die Gattung *Klebsiella*, benannt nach dem Mikrobiologen Theodor Albrecht Edwin Klebs, umfasst Gram-negative, unbewegliche, bekapselte, fakultativ anaerobe Stäbchenbakterien, die der Familie der *Enterobacteriaceae* angehören [1, 2]. Klebsiellen kommen ubiquitär in der Umwelt vor. Sie werden in Abwässern und Oberflächengewässern, im Boden sowie auf Pflanzen, aber auch auf medizinischen Geräten gefunden [2, 3]. Bei Menschen und Tieren besiedeln sie als Saprophyt den Nasopharynx und den Gastrointestinaltrakt [4]. Als fakultativ pathogene Erreger sind Klebsiellen eine häufige Ursache für Infektionen bei Mensch und Tier [5].

## 1.2. *Klebsiella pneumoniae*

1882 erkannte Carl Friedländer als Erster *K. pneumoniae* als bakteriellen Erreger der Lungenentzündung [6]. Heute zählt *K. pneumoniae* zu den weltweit wichtigsten Infektionserregern. Phylogenetische Studien (Ganzgenomanalysen) haben gezeigt, dass ein wesentlicher Anteil der klinischen Isolate, die zuvor als *K. pneumoniae* identifiziert wurden, eigentlich anderen eng verwandten Arten zuzuordnen sind. Zusammen mit der ursprünglichen Spezies *K. pneumoniae sensu stricto* (Kp1) bilden *K. quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae* (Kp2), *K. variicola* subsp. *variicola* (Kp3), *K. quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* (Kp4), *K. variicola* subsp. *tropica* (Kp5) und *K. quasivariicola* (Kp6) sowie *K. africana* (Kp7) den „Species Complex“ *K. pneumoniae sensu lato* (KpSC) [7-9].

Der wichtigste Vertreter der Gattung im Zusammenhang mit nosokomialen Infektionen ist die Spezies *K. pneumoniae sensu stricto* [2, 10, 11]. Der opportunistische Krankheitserreger verursacht bei immundefizienten Personengruppen wie Neugeborenen, älteren und multimorbiden Patienten schwerwiegende Infektionen [12, 13]. Zu den Krankheitsbildern zählen Infektionen des Respirations- und Urogenitaltrakts sowie Meningitiden und Septikämien [14]. Das Verbreitungsvermögen des Erregers und eine zunehmende Resistenzentwicklung erschweren die Behandlung von *K. pneumoniae*-Infektionen zusätzlich [15, 16]. In den letzten drei Jahrzehnten ist außerdem

die Verbreitung eines neuen hypervirulenten Pathotyps, der mit einer hohen Morbidität und Mortalität verbunden ist, zu beobachten [17-21].

### **1.3. Genomische Eigenschaften und Diversität von *K. pneumoniae***

Gene, die innerhalb einer Bakterienspezies konserviert vorliegen, werden als Kerngenom bezeichnet. Das *K. pneumoniae* Genom kodiert zwischen 5000 und 6000 Gene, wovon etwa 2000 dem Kerngenom zugeordnet werden [6]. Der weitaus größere Anteil besteht aus dem akzessorischen (erworbenen) Genom. Diese Gene variieren zwischen den einzelnen Vertretern der Spezies und sind für die genetische Vielfalt und Plastizität von *K. pneumoniae* verantwortlich [7]. Akzessorische Gene werden durch horizontalen Gentransfer (HGT) mobiler genetischer Elemente (MGE) erworben. Zu diesen Elementen zählen Plasmide, Transposons (Tn), integrative und konjugative Elemente (ICE), Insertionssequenzen (IS) und Bakteriophagen [8]. MGE können Faktoren vermitteln, die für das Entstehen von Antibiotika-resistenten und virulenten *K. pneumoniae*-Isolaten sowie für die Adaption an Umweltbedingungen und Wirtsorganismen verantwortlich sind [7, 9-11]. So zeigen *K. pneumoniae*-Isolate aus der Umwelt sowie von Menschen und von Tieren eine hohe genetische Vielfalt. Doch auch unter *K. pneumoniae*-Isolaten, die das gleiche Habitat besiedeln - wie den Gastrointestinaltrakt des Menschen - ist ein hohes Maß an Diversität zu beobachten [12-14]. Trotz des vielfältigen Pools an akzessorischen Genen und Anpassungsmechanismen an mannigfaltige Nischen sind global erfolgreich verbreitete, multiresistente (siehe 1.5) oder virulente Varianten (siehe 1.6) auf wenige *K. pneumoniae*-Linien beschränkt [14].

### **1.4. *K. pneumoniae* Genotypisierung**

In medizinischen Diagnostiklaboratorien werden *K. pneumoniae* mit Hilfe von phänotypischen (z.B. die Kapsel-Serotypie und die Antibiotika-Resistenztestung) und molekularbiologischen Methoden (z.B. PCR-basierte Bestimmung der Kapseltypen und wichtiger Resistenzgene) charakterisiert. Weitere klassische Methoden zur Verwandtschaftsanalyse, wie die enzymatische Restriktion der DNA und das Auftrennung der Fragmente mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese sind sehr zeitaufwändig und haben ein zu geringes Auflösungsvermögen für eng verwandte Stämme innerhalb der weltweit erfolgreichen *K. pneumoniae*-Linien im medizinischen Bereich [14]. Für eine

bessere Auflösung müssen daher die Ganzgenom-Daten der Isolate herangezogen werden, einschließlich der Charakterisierung der Kapsel- und Sequenztypen sowie der Antibiotikaresistenz- und Virulenzgene.

#### 1.4.1. Kapseltypisierung

Eine klassische Methode, die seit den 1920er Jahren zur Charakterisierung von *K. pneumoniae*-Isolaten und zur Beantwortung epidemiologischen Fragestellungen eingesetzt wird, ist die Serotypie [15, 16]. *K. pneumoniae* besitzen eine Kapsel aus Exopolysacchariden (EPS), deren Synthese durch einen Wzx/Wzy-abhängigen Syntheseweg erfolgt [17]. Die daran beteiligten Gene werden chromosomal in einem 10-30 kbp großen *capsule polysaccharide synthesis*-Gencluster (*cps*-Gencluster) kodiert. Während Gene für die Translokation und Prozessierung der CPS an der Zelloberfläche innerhalb der Spezies konserviert vorliegen, sind die für die Polymerisation und den Zusammenbau spezifischer CPS-Untereinheiten notwendigen Gene variabel und entscheidend für die Diversität des Kapseltyps (K-Typ) [18-22]. Gegenwärtig sind 79 serologische K-Typen nachweisbar (Stand 2020) [20, 23, 24]. Die Nachteile dieser Methode liegen im Wesentlichen in einem hohen Kosten- und Zeitaufwand sowie einer geringen Spezifität und Sensitivität [2, 20]. Heutzutage hat sich die Ganzgenomsequenzierung zu einem wichtigen Werkzeug der *K. pneumoniae*-Charakterisierung und der K-Typ-Bestimmung entwickelt [25]. Ausgehend von den Ganzgenom-Daten werden mithilfe des *Kaptive* Software Tools Referenzbasierte Sequenzunterschiede im *cps*-Gencluster ermittelt und 134 distinkten Kapseltypen zugeordnet [25, 26].

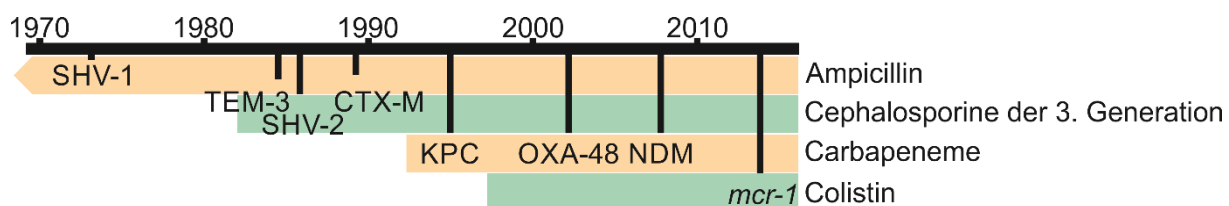
#### 1.4.2. Multilokus-Sequenztypisierung

Das *Multi-locus Sequence Typing* (MLST) ist eine Methode der Typisierung von Bakterien, die auf Allelvarianten konservierter *Housekeeping*-Gene beruht [27, 28]. Anhand der Allelkombinationen werden spezifische Sequenztypen definiert. Das MLST-Schema für den *K. pneumoniae* Spezies Komplex wurde 2005 von Diancourt *et al.* veröffentlicht und verwendet folgende Gene: *gapA* (Glycerinaldehyd-Phosphat-Dehydrogenase), *infB* (Translationsinitiationsfaktor 2), *mdh* (Malat-Dehydrogenase), *pgi* (Phosphoglukose-Isomerase), *phoE* (Phosphorin E), *rpoB* (Beta-Untereinheit der RNA-Polymerase) und *tonB* (*Periplasmic energy transducer*) [28]. Das *core genome* MLST

(cgMLST) ist eine Erweiterung des MLST und ist heute Bestandteil kommerzieller NGS-Auswertesoftware wie *SeqSphere* und *BioNumerics* [29, 30]. Diese Methode der Erregertypisierung von *K. pneumoniae* basiert auf dem Sequenzvergleich von 2358 Genen des Kerngenoms, wodurch eine höhere Diskriminierung zwischen eng verwandten phylogenetischen Gruppen erreicht wird [29, 30].

### 1.5. Antibiotikaresistenzen in *K. pneumoniae*

Das Auftreten und das Verbreitungsvermögen von mehrfachresistenten *K. pneumoniae* wird als eine ernstzunehmende Bedrohung der öffentlichen Gesundheit („*Public Health Threat*“) eingeschätzt [7]. Die meisten *K. pneumoniae* besitzen intrinsisch die chromosomal kodierte Beta-Laktamase SHV-1, die eine natürliche Resistenz gegenüber Antibiotika wie Ampicillin, Amoxicillin, Carbenicillin und Ticarcillin vermittelt [31, 32].

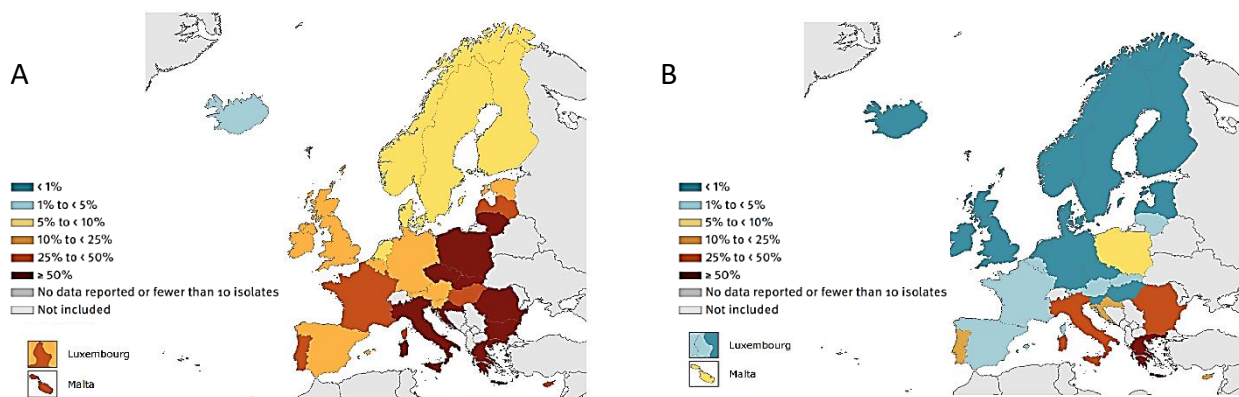


**Abbildung 1: Zeitachse der Antibiotikaresistenz-Entwicklung bei *K. pneumoniae*.** Modifiziert nach Wyres and Holt, 2018 [45]

Wie in Abbildung 1 dargestellt, führten Mutationen im Beta-Laktamase-Gen *bla*<sub>SHV-1</sub> zu einer Erweiterung des Substratspektrums [33]. Bakterien, die über eine derartige *extended-spectrum beta-lactamase* (ESBL) verfügen, sind zusätzlich resistent gegen Cephalosporine der 3. Generation [34, 35]. Die meisten Resistenzen werden jedoch nicht chromosomal vermittelt, sondern über HGT erworben [36, 37]. Die Aufnahme und Verbreitung von Plasmiden, die verschiedene Antibiotikaresistenz-Gene tragen, spielt eine entscheidende Rolle bei der *intra*- und *interspezies* Verbreitung von Antibiotikaresistenzen [38]. Zu den Plasmid-vermittelten ESBL-Genen zählen u.a. CTX-M-, TEM- und SHV-Varianten [39, 40]. In Deutschland waren 2019 rund 12,2% aller invasiven *K. pneumoniae*-Isolate resistent gegen Cephalosporine der 3. Generation; im europäischen Vergleich weisen einige Länder in Süd- und Osteuropa (z.B. Italien, Griechenland, Polen und Bulgarien) noch höhere Raten auf (Abbildung 2). Die Resistenzstatistik des Robert Koch-Institutes, erstellt aus Daten von rund 500 Krankenhäusern und 10000 Arztpraxen, hat für 2019

Resistenzraten für Cephalosporine der 3. Generation bei *K. pneumoniae* im ambulanten Bereich von 8%, im stationären Bereich von 12% und von 16% auf Intensivstationen ermittelt (<https://ars.rki.de/>).

Carbapeneme wie Meropenem und Imipenem waren bisher das Mittel der Wahl zur Therapie von Infektionen mit ESBL-bildenden Stämmen [6, 41, 42]. Der vermehrte Einsatz führte jedoch zu einem erhöhten Selektionsdruck und zudem zu einem Auftreten von Carbapenem-resistenten *K. pneumoniae*-Stämmen [6]. Diese Resistenz beruht zum Einen auf der Bildung von Plasmid-kodierten Carbapenemasen und zum Anderen auf chromosomalen Mutationen, die eine verminderte Porinbildung oder eine erhöhte Aktivität von Effluxpumpen zur Folge haben [43-45]. Weltweit häufige Carbapenemasen wie KPC (*Klebsiella-pneumoniae*-Carbapenemase), VIM (Verona-Integron-Metallo- $\beta$ -Laktamase), NDM (New-Delhi-Metallo- $\beta$ -Laktamase) und OXA-48 (Oxacillinase-48) sind in der Lage neben Carbapenemen auch die meisten Penicilline und Cephalosporine zu hydrolysieren. Somit führt der Erwerb eines Carbapenemase-Gens zu einer breiten Resistenz gegen fast alle Beta-Laktam-Antibiotika [46]. Die Resistenzraten bei invasiven *K. pneumoniae* für Carbapeneme betrug 2019 in Deutschland <1% (Abbildung 2) [47]. Obgleich die Resistenzrate in Deutschland im Vergleich zu anderen europäischen Ländern noch vergleichsweise gering ist, wurde zwischen den Jahren 2011 und 2016 eine Verdopplung der Rate verzeichnet [48].



**Abbildung 2: Anteil (%) invasiver *K. pneumoniae*-Isolate mit Resistenz gegenüber (A) Cephalosporinen der 3. Generation und (B) Carbapenemen im Jahr 2019 im europäischen Vergleich.**

Quelle: EARS-Net-Datenbank. [47]

Bei den Vertretern der *Enterobacteriaceae* tritt die Carbapenemresistenz bei *K. pneumoniae* weltweit besonders häufig im medizinischen Bereich auf [49]. Zur Therapie von Infektionen mit

Carbapenem-resistenten *K. pneumoniae* stehen aktuell noch Antibiotika wie Colistin (Polymyxin) zur Verfügung, die als Reserveantibiotika zurückgehalten werden, deren Einsatz allerdings als bedenklich hinsichtlich ihrer Verträglichkeit und der schnellen Resistenzentwicklung gilt [50, 51]. In den letzten Jahren ist jedoch bereits das Aufkommen von Isolaten zu beobachten, die aufgrund von Mutationen im regulatorischen *mgrB*-Gen oder durch das Plasmid-vermittelte *mcr*-Gen resistent gegenüber Colistin sind [6].

Carbapenem- und Colistin-resistente *K. pneumoniae* werden entsprechend als pan-resistent eingestuft, da für sie keine konventionellen Therapiemöglichkeiten mehr zur Verfügung stehen und die Infektion von einem stark erhöhten Mortalitätsrisiko begleitet wird [52]. Solche Stämme traten gelegentlich auch in Deutschland auf [53, 54]. Um dieser Entwicklung entgegenzuwirken wird an neuen Antibiotika (z.B. Cefiderocol), neuen Beta-Laktamasehemmern (z.B. Avibactam) und neuartigen Therapieansätzen, wie dem Einsatz von Phagen und Antikörpern, geforscht [55].

Antibiotikaresistenzen treten unabhängig von phylogenetischen Linien oder klonalen Gruppen auf. Dennoch sind einzelne *K. pneumoniae*-Stammvarianten (z.B. ST258/ST512 mit KPC-2 Carbapenemase-Bildung; ST15, ST101, ST11 und ST147 mit Bildung verschiedener Carbapenemasen und/oder ESBL) besonders weit verbreitet [7, 56-58]. Warum diese *K. pneumoniae*-Linien so erfolgreich sind, ist aber bisher nur unzureichend erforscht.

## 1.6. Hypervirulente *K. pneumoniae*

Seit den 1980er werden zunehmend Infektionen durch hypervirulente *K. pneumoniae* (hvKp) beobachtet, die Mediziner und Laboratorien vor neue Herausforderungen stellen [59-62]. Während die sogenannten „classic“ *K. pneumoniae* (cKp) besonders immunsupprimierte Personen gefährden, verursachen hvKp schwere, invasive Infektionen bei jungen Menschen ohne erkennbare Primärerkrankung, die mit einer hohen Morbidität und Mortalität einhergehen können und zudem außerhalb von Gesundheitseinrichtungen erworben (*community acquired*) werden [63-65]. Als Kardinalsymptom einer hvKp Infektion wird die Ausbildung eines pyogenen Leberabszesses, dem keine erkennbare primäre hepatobiliäre Erkrankung zugrunde liegt, beschrieben [61]. Weitere Krankheitsbilder sind schwere Infektionen der Augen, der Hirnhaut, der Knochen als auch eine

nekrotisierende Faszitis [61, 66]. Die ersten Berichte über hvKp-Infektionen stammen aus dem asiatisch-pazifischen Raum, der als Ursprung dieses Pathotyps betrachtet wird [61, 62]. Heute sind hvKp auf der ganzen Welt verbreitet [67, 68]. Ganzgenom-basierte Analysen zeigen, dass *K. pneumoniae*-Isolate aus diesen invasiven Infektionen einigen wenigen Sequenztypen (ST23, ST57, ST66, ST86, ST375, ST380) und den Kapseltypen K1 und K2 innerhalb der *K. pneumoniae*-Populationen zuzuordnen sind [11, 14]. Anfänglich präsentierten hvKp-Stämme einen voll sensiblen Phäno- und Genotyp gegenüber Antibiotika [69]. In den vergangenen Jahren wurden jedoch zunehmend hvKp aus invasiven Infektionen isoliert, die ein breites Resistenzspektrum zeigen [70-74]. Die Entwicklung solcher „dual risk“ *K. pneumoniae*-Stämme, die sowohl Antibiotika-resistent als auch hypervirulent sind, begrenzt die Behandlungsmöglichkeit stark und stellt die Medizin vor noch größere Herausforderungen [75].

#### **1.6.1. Definition hypervirulenter *K. pneumoniae***

Für hvKp gibt es klinische, phänotypische und genotypische Definitionsansätze. Ein invasiver Verlauf, mit einer vorwiegend hepatischen Beteiligung und einer metastasierenden Ausbreitung in jungen primär gesunden Menschen ließe eigentlich wenig Spielraum für Diskussionen über die klinische Definition einer hvKp-Infektion [76]. Jedoch ist die Problematik aufgrund der geringen Prävalenz in den westlichen Ländern unter Medizinern wenig präsent [62]. Eine der größten Herausforderungen besteht in der Labordiagnostik von hvKp-Isolaten, da es bisher weder eine einheitliche Definition noch verlässliche Biomarker für eine phäno- und genotypische Abgrenzung von hvKp-Isolaten zu ckp gibt [76].

Ein phänotypisches Merkmal, das von Beginn an mit hvKp-Isolaten assoziiert wurde, ist ein hypermukovisköser Phänotyp kultivierter Stämme. Als Nachweismethode eines hypermukoviskösen Phänotyps gilt der String-Test (Abbildung 3) [77]. Dabei wird mit einer Impfpöse eine Bakterienkolonie von einer Agarplatte aufgenommen. Das Testergebnis gilt als positiv, wenn dabei ein mehr als 5 Millimeter langer Schleimfaden entsteht [78]. Der String-Test hat jedoch eine geringe Spezifität und Sensitivität. Aus Studien mit *K. pneumoniae*-Isolaten aus invasiven Verläufen geht hervor, dass die Prävalenzangaben von Hypermukoviskosität unter invasiven Isolaten zwischen 51%

und 98% schwanken [77, 79-82]. Ein negativer String-Test alleine ist somit kein Ausschlusskriterium von Hypervirulenz [68].



**Abbildung 3: Positiver String-Test eines hypermukoviskösen *K. pneumoniae*-Isolates.** Quelle: Kumabe and Kenzaka, 2014 [78]

Genotypische Analysen haben gezeigt, dass die Serotypen K1 und K2 besonders häufig unter invasiven *K. pneumoniae*-Isolaten mit positivem String-Test vertreten waren, weswegen sie als hypervirulente Serotypen angesehen werden [80, 83, 84]. Auch wenn diese Serotypen nach wie vor eine hohe Prävalenz zeigen, werden heute weitere Kapseltypen wie K5, K20, K54 und K57 mit invasiven Linien in Verbindung gebracht [76, 85, 86]. Des Weiteren wurde ein hypermukovisköser Phänotyp für Serotypen nachgewiesen, die nicht mit Hypervirulenz assoziiert werden [14, 68, 87, 88]. Außerdem wurde gezeigt, dass sich Hypervirulenz auf wenige Linien zu beschränken scheint [14]. Darunter zeigt der Sequenztyp ST23 (CG23) die höchste Prävalenz weltweit und eine starke Assoziation mit dem Serotyp K1 [61]. Hingegen zeigen Isolate mit anderen Hypervirulenz-assoziierten Serotypen eine höhere genetische Diversität und werden den Sequenztypen ST25, ST57 (CG23), ST65, ST66, ST86, ST375 und ST380 zugeordnet [89-92].

In vergleichenden Genomanalysen wurden MGE identifiziert, welche mit einer gesteigerten Virulenz assoziiert werden. Dazu gehören die Plasmide pK2044 (NTUH-K2044 ST23-K1) und pLVPK (Kp52.145 ST66-K2) sowie chromosomal integrierte ICEKp [11, 93-95]. Die zwei etwa 200 kbp großen, nicht-konjugativen Plasmide besitzen den Replikontyp IncFIB<sub>K</sub>, kodieren die Siderophorsysteme Aerobactin (*iuc*) und Salmochelin (*iro*) sowie Regulatoren für eine gesteigerte Kapselsynthese (*rmpA*, *rmpA2*) [14, 62, 85, 96-98]. ICEKp mobilisieren die Siderophorsysteme Colibactin (*clb*) und Yersiniabactin (*ybt*) sowie Aerobactin (*iuc*) und die Kapselsynthese-Regulatoren (*rmpA/rmpA2*) [11, 90, 99].



## 1.7. Virulenzfaktoren

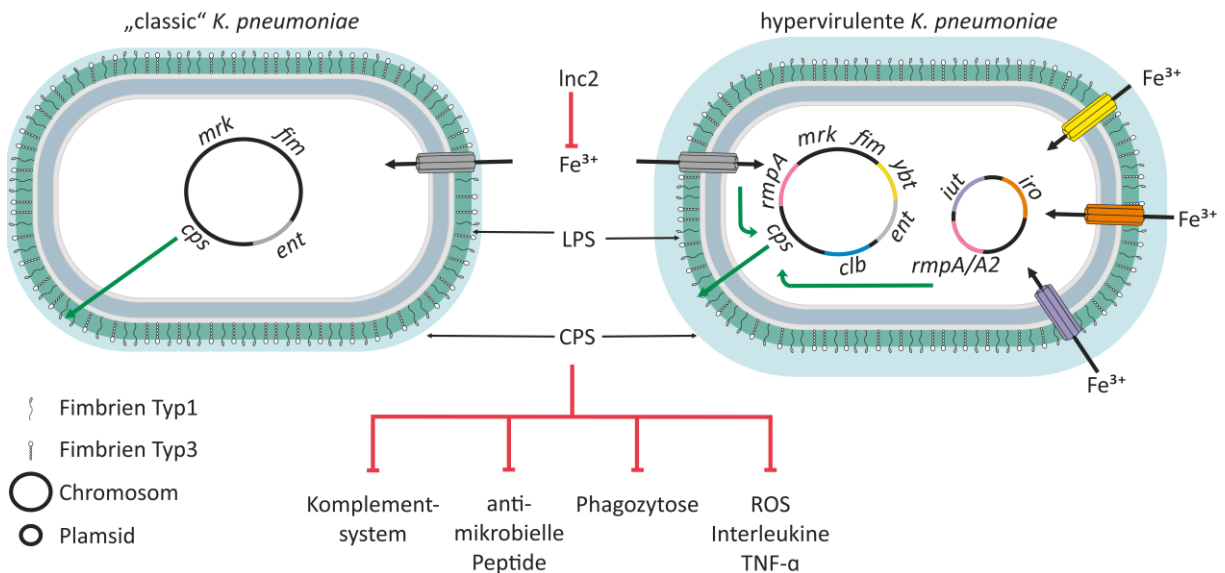
*K. pneumoniae* besitzen eine Reihe von Faktoren, die die Neigung einzelner Stammvarianten erhöhen, Krankheiten bei Mensch und Tier auszulösen. Im Folgenden werden *K. pneumoniae*-Virulenzfaktoren betrachtet, die besonders bei *K. pneumoniae*-Isolaten aus schweren Infektionen beobachtet wurden [14, 62, 76, 100].

### 1.7.1. Kapsel

Die Kapsel ist einer der wichtigsten und am besten charakterisierten *K. pneumoniae*-Virulenzfaktoren [22, 107]. Sie besteht aus einer dicken Schicht aus Polysacchariden (Abbildung 4). Wie zuvor unter 1.4.1 beschrieben, werden anhand der exponierten Polysaccharide *K. pneumoniae*-Serotypen definiert, die sich in ihrem Virulenzpotential unterscheiden. Die Kapsel schützt vor Antibiotika, vor antimikrobiellen Peptiden und vor der Erkennung durch das Wirtsimmunsystem sowie vor Entzündungsprozessen (Reaktive Sauerstoffspezies, Interleukine und TNF) [107-114]. Nicht-bekapselte Stammvarianten sind anfälliger für die Opsonierung durch das Komplementsystem und die Phagozytose durch Immunzellen [14, 115-117].

### 1.7.2. Regulatoren des mukoiden Phänotyps A2 (*rmpA/rmpA2*)

Einige *K. pneumoniae* besitzen Faktoren, die eine exzessive Kapselproduktion ermöglichen und mit einem hypermukoviskösen Phänotyp sowie einer gesteigerten Virulenz assoziiert werden [101, 102]. 1989 beschrieben Nassif *et al.* erstmals den Plasmid-vermittelten Regulator des mukoiden Phänotyps A (RmpA) und dessen Einfluss auf die Kapselsynthese von *K. pneumoniae* [94, 101]. 1993 identifizierten Wacharotayankun *et al.* das 15 Aminosäuren längere *rmpA2*-Gen, welches eine etwa 80%ige Homologie zum *rmpA*-Gen aufweist und auf demselben Plasmid kodiert wird [14, 94, 103]. Sowohl *rmpA* als auch *rmpA2* besitzen am C-Terminus eine konservierte DNA-Bindedomäne, welche an den Promotor des *cps*-Genclusters bindet und somit eine übermäßige Polysaccharidsynthese initiiert [22, 94, 104]. Einige *K. pneumoniae*-Isolate besitzen neben den beiden Plasmid-kodierten Genen ein chromosomales *rmpA*-Gen, welches über ICEKp1 mobilisiert und integriert wurde [22, 95].



**Abbildung 4: Schematischer Vergleich des Repertoires an Pathogenitätsfaktoren von cKp- und hvKp-Stämmen.** Sowohl cKp (links) als auch hvKp (rechts) besitzen Adhäsine des Fimbrien Typs 1 und des Typs 3 sowie das Siderophor Enterobactin (*ent*). Hypervirulente Stämme besitzen im akzessorischen Anteil des Genoms weitere Virulenzfaktoren, wie die Transkriptionsregulatoren für die Polysaccharidsynthese (*rmpA/rmpA2*), die Siderophore Yersiniabactin (*ybt*), Salmochelin (*iro*) und Aerobactin (*iut*) für eine effizientere Eisenaufnahme sowie das Genotoxin Colibactin (*clb*) für einen zytopathischen Effekt (Modifiziert nach Paczosaa and Mecsas, 2016) [65].

### 1.7.3. Siderophore

Wie für die meisten Organismen ist Eisen für *K. pneumoniae* ein wichtiger Faktor für zelluläre Prozesse und das Wachstum [105, 106]. Ein grundlegender Abwehrmechanismus des Wirtsimmunsystems besteht daher in der Begrenzung des Zugangs zu freiem Eisen [65]. Viele Bakterien sezernieren daher eisenbindende Proteine, sogenannte Siderophore, um kompetitiv Eisen von Wirtsproteinen abfangen zu können [107, 108]. Besonders das Vorhandensein der Siderophorsysteme Enterobactin, Salmochelin und Yersiniabactin sowie Aerobactin (Abbildung 4) werden mit invasiven Verläufen assoziiert [7, 14, 109].

Wie die meisten Vertreter der *Enterobacteriaceae* kodiert *K. pneumoniae* chromosomal Enterobactin, welches die höchste Affinität der oben genannten Proteine gegenüber Eisen aufweist [110, 111]. Zur Abwehr bilden Immunzellen und die Schleimhaut des Wirts wiederum Lipocalin-2 (Lcn2), welches Enterobactin bindet und dessen Eisenkomplexierung hemmt [112].

Yersiniabactin, Salmochelin und Aerobactin werden über HGT erworben und können nicht durch Lcn2 inhibiert werden [14, 65, 113, 114]. Das Yersiniabactin hat unter klinischen

*K. pneumoniae*-Isolaten eine Prävalenz von 40% und wird durch ICEKp mobilisiert und ins Chromosom integriert.

Salmochelin ist eine glykosylierte Form von Enterobactin und wird zusammen mit Aerobactin auf Plasmiden kodiert. Aerobactin hat von allen Siderophoren die niedrigste Bindungsaffinität zu Eisen, wird aber dennoch aufgrund seiner hohen Prävalenz in hvKp-Linien als das wichtigste Siderophor betrachtet [109, 111, 114, 115]. Ganzgenomstudien zeigten, dass mit steigender Anzahl an exprimierten Siderophoren das Virulenzpotential zunimmt. Hypervirulente *K. pneumoniae* verfügen daher über besonders viele Siderophore [7].

#### **1.7.4. Colibactin**

Einige Mitglieder der Familie der *Enterobacteriaceae* sezernieren das Genotoxin Colibactin (*clb*), welches die DNA schädigt und zum Zelltod eukaryotischer Zellen führt [116, 117]. Innerhalb der Spezies *K. pneumoniae* besitzen vorwiegend hypervirulente Isolate des Sequenztyps ST23 das *clb*-Gen, welches durch HGT erworben und über das ICEKp10 ins Chromosom integriert wurde. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass die Synthese von Colibactin die Darmkolonisierung und Freisetzung von hvKp-Isolaten ins Blut und in Organe begünstigt. [14, 118]

### **1.8. *K. pneumoniae* Pathogenese**

#### **1.8.1. Kolonisation**

*K. pneumoniae* gehört zur natürlichen Mikrobiota von Menschen und Tieren [119]. Die Kolonisierung des Wirtsorganismus ist ein entscheidender Schritt in der Pathogenese [6, 65, 120]. In den westlichen Ländern sind 1% - 5% der Bevölkerung nasopharyngeale und bis zu 35% gastrointestinale Träger [62]. Die Transmission erfolgt über kontaminierte Lebensmittel, von Mensch zu Mensch sowie durch zoonotische Übertragungen [62]. Während *K. pneumoniae* gesunde Menschen meist asymptomatisch besiedelt, kann das Bakterium bei immunsupprimierten Personen ernsthafte Infektionen verursachen [2]. Vergleichende Genomanalysen von Kolonisations- und Infektionsisolaten konnten zeigen, dass 50% der nosokomialen Infektionen mit einer vorangegangenen Kolonisation assoziiert sind und dass der Gastrointestinaltrakt das Hauptreservoir ist [6, 14, 121].

*K. pneumoniae* zeichnet sich zudem durch ein schnelles Verbreitungsvermögen und zunehmende Resistenzentwicklung aus. So sind multiresistente *K. pneumoniae*-Stämme immer häufiger Verursacher nosokomialer Ausbruchsgeschehen. Hier erfolgt die Übertragung über den Kontakt mit kontaminierten Gegenständen und/oder Personen [122-124]. Warum bestimmte *K. pneumoniae*-Linien so erfolgreich sind, ist aber bisher nur unzureichend bekannt. Mitverantwortlich für steigenden Kolonisations- und Infektionsraten ist der Einsatz von Antibiotika. Durch die Einnahme von Antibiotika wird die normale Darmflora beeinträchtigt und resistente Stämme werden selektiv angereichert [62, 124].

Aufgrund der noch vergleichsweise geringen Prävalenz in den westlichen Ländern, gibt es keine Angaben zu Kolonisierungsraten durch hvKp. In ersten Studien im asiatischen Raum werden hingegen schon Kolonisierungsraten zwischen 4,6% und 14,9% angegeben. Diese Schwankungen sind darauf zurückzuführen, dass für die Klassifizierung bisher keine einheitlichen Biomarker zugrunde liegen [62].

### **1.8.2. Adhäsion**

Eine entscheidende Rolle für die Kolonisierung und für die nachfolgenden Schritte der Pathogenese ist die Adhäsion an Epithelzellen [142]. Allerdings erschweren mechanische Kräfte, wie die Bewegung von Flimmerhärchen in den Atemwegen, die Darmperistaltik und der Harnfluss, die Adhäsion von Bakterien an den Epithelien [143, 144]. Somit ist die Fähigkeit zur Adhäsion ein entscheidender Faktor für die Virulenz eines Bakteriums [145].

*K. pneumoniae* exprimieren an ihrer Zelloberfläche fadenförmige Fimbrien des Typs 1 und Typs 3 [146]. Fimbrien vom Typ 1 werden chromosomal durch das *fim* Gencluster kodiert und vermitteln eine Mannose sensitive Adhäsion. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass Typ 1 Fimbrien phasenvariabel in den Harnwegen jedoch nicht im Gastrointestinaltrakt exprimiert werden [146].

Typ 3 Fimbrien werden ebenfalls chromosomal kodiert, allerdings durch das *mrk* Gencluster. Sie vermitteln eine Mannose-resistente Adhäsion an Endothel- und Epithelzellen der Atem- und Harnwege [147]. Welche adhäsiven Strukturen im Gastrointestinaltrakt eine Adhäsion an das Darmepithel vermitteln, ist jedoch noch nicht bekannt [148]. Die wichtigsten Funktionen der

Typ 3 Fimbrien sind die Bindung an abiotische Oberflächen und die Biofilmbildung [14, 149, 150]. Diese Fähigkeit birgt besonders in der Anwendung von intensiv-medizinischen Maßnahmen Risiken. Durch die Fähigkeit an medizinischen Materialien wie Endotrachealtuben und Blasenkathe-tern zu haften, steigt das Risiko von Beatmungs-assoziierten Pneumonien und Katheter-assoziierten Harnwegsinfektionen durch *K. pneumoniae* [151].

### 1.8.3. Invasion

*K. pneumoniae* wurde lange Zeit als ein klassischer extrazellulärer Erreger beschrieben, dessen Translokation über Microläsionen in den Epithelien der Atem- und Harnwege sowie des Darmtrakts ermöglicht wird [62, 65]. Des Weiteren wurde von *Cano et al.* ein zytotoxischer Effekt von *K. pneumoniae* auf Lungenepithelzellen beobachtet, der eine Zerstörung der Integrität des Zellverbands zur Folge hat und so den Bakterien den Übertritt in die Blutbahn ermöglicht. Sie folgerten, dass die toxische Reaktion mit den von *K. pneumoniae* exponierten Kapselpolysacchariden assoziiert ist [125]. Einige virulente *K. pneumoniae*-Stämme bilden das Endotoxin Colibactin, welches ebenfalls einen zytopathischen Effekt auf Wirtszellen hat [14, 116].

Invasionsstudien haben jedoch gezeigt, dass *K. pneumoniae* die Fähigkeit zur zellulären Invasion besitzen. Die zelluläre Invasion ist die Fähigkeit von Bakterien in Wirtszellen einzudringen und Grundlage der Transzytose, um auf diesem Weg in die Blutbahn zu gelangen [126, 127]. Im Mausmodel begünstigt die Expression des Fimbrien Typs 1 die Invasion ins Blasenepithel [128]. Oft kommt es nach Primärtherapien von Blasenentzündungen durch *K. pneumoniae* zu Rezidiven. Es wird daher angenommen, dass eine intrazelluläre Lokalisation die Bakterien vor Antibiotika schützt und dies chronische Harnwegsinfektionen durch *K. pneumoniae* zur Folge hat [129, 130].

Neben dem Urogenitaltrakt ist der Gastrointestinaltrakt eine weitere Haupteintrittspforte für *K. pneumoniae*. *Hus et al.* konnten im Zellkulturmodel zeigen, dass *K. pneumoniae* über einen transzellulären Weg die Barrierefunktion des Darmepithels überwindet und somit in die Blutbahn disseminieren kann [62, 131]. Basierend auf diesem Model wird über die Interaktion von *K. pneumoniae* mit dem Wirtsepithel eine Rho-GTPase- und Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt-abhängige Signalkaskade induziert. Dies führt zur Umstrukturierung des Zytoskeletts und der Aufnahme des Erregers in Vakuolen in denen sie sich replizieren können [127, 131]. Welche

Epithelstrukturen an der Pathogen-Wirts-Interaktion und der Aktivierung der Signalkaskade beteiligt sind, konnte bisher allerdings nicht gezeigt werden [131].

#### 1.8.4. Serum- und Phagozytoseresistenz

Nachdem es den Bakterienzellen gelungen ist in die Blutbahn zu disseminieren, werden sie mit humoralen und zellulären Abwehrmechanismen konfrontiert. Zur humoralen Abwehr gehören antimikrobielle Peptide und das Komplementsystem. Das Komplementsystem erkennt bakterielle Oberflächenstrukturen und aktiviert verschiedene Effektormechanismen. Über die Erkennung von Lipopolysacchariden (LPS), Kapselpolysacchariden (CPS) und äußeren Membranproteinen (OMP) von *K. pneumoniae* wird die Komplementkaskade auf dem klassischen (Antikörper-Antigen-Komplex) und dem Lektin-Weg (Mannose-bindende Proteine) aktiviert. Dies führt zur Bildung von Konvertasen, die den Proteinkomplex C3 in seine Untereinheiten C3a und C3b spalten. Die Untereinheit C3b lagert sich an die Zelloberfläche des Bakteriums an und aktiviert so zusätzlich den alternativen Weg der Komplementkaskade. Auf diesem Weg kommt es erneut zu einer Spaltung von C3 und somit zu einer Akkumulierung von C3b auf der Zelloberfläche. Einige Konvertasen spalten neben C3 auch C5, dessen Spaltprodukte die Bildung eines Membranangriffskomplexes (MAC) initiieren, der zur Lyse der Bakterienzelle führt [132].

Um der Erkennung durch das Komplementsystem zu entgehen besitzen *K. pneumoniae* Faktoren die zum Überleben im Wirtsorganismus beitragen. Wie zuvor unter 1.7.1 beschrieben, ist die Kapsel ein entscheidender Virulenzfaktor [6, 133]. Eine gesteigerte Polysaccharidsynthese führt zu einer dicken Kapselschicht. Diese maskiert die Erkennungsstrukturen und schützt vor Zelllyse und Opsonierung durch Immunzellen sowie vor antimikrobiellen Peptiden [134]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass einige *K. pneumoniae* K-Antigene und O-Antigene nicht durch das Komplementsystem erkannt werden [135, 136]. Ebenso können Mutationen in OMP-kodierenden Genen die Zugänglichkeit für das Komplementsystem verändern [137].

Die Kapsel vermittelt außerdem Schutz vor zellulären Abwehrmechanismen. Es konnte gezeigt werden, dass bekapselte *K. pneumoniae*-Isolate die Entzündungsreaktion unterdrücken und folglich weniger Zytokine sezerniert werden, als bei Infektionen mit unbekapselten Isolat. Dadurch wird die Rekrutierung von und die Phagozytose durch Immunzellen verhindert [65].

### **1.9. Zoonotisches Potential von *K. pneumoniae***

*K. pneumoniae* wird als zoonotischer Infektionserreger beschrieben, der sowohl vom Tier auf den Menschen als auch *vice versa* übertragen werden kann [138]. Wie beim Menschen gehören auch bei Tieren Infektionen der Atem- und der Harnwege zu den häufigsten Krankheitsbildern. Darüber hinaus verursachen *K. pneumoniae* häufig Mastitiden bei Rindern und Schweinen sowie Gebärmutterentzündungen bei Pferden [139]. Populationsstudien von *K. pneumoniae* aus Lebensmitteln, Wild-, Nutz- oder Haustieren sind selten. Vereinzelt konnten *K. pneumoniae*-Linien wie ST11, ST15, ST23 und ST25 aus humanen Infektionen bei Haustieren und Nutztieren nachgewiesen werden [14]. Darüber hinaus sind Fragen nach der Herkunft von Antibiotikaresistenzen und Virulenzfaktoren sowie nach möglichen Transmissionswegen zwischen humanen und tierischen Reservoiren unbeantwortet.

## **1.10. Zielstellung dieser Arbeit**

Im Rahmen der German One Health Initiative (GOHI) arbeiten die Bundeseinrichtungen Friedrich-Loeffler-Institut (FLI), das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), das Paul-Ehrlich-Institut (PEI) und das Robert Koch-Institut (RKI) in einer fachübergreifenden Kooperation seit 2018 zusammen. Ziel dieser interdisziplinären Zusammenarbeit von Experten der Tier-, Human- und Umweltmedizin ist eine effiziente Prävention und Bekämpfung von zoonotischen Infektionskrankheiten. Im Rahmen des GOHI-Projektes wurden in der vorliegenden Arbeit folgende Studien zu dem zoonotischen Pathogen *K. pneumoniae* am RKI und am PEI sowie unter Einbeziehung des BfR durchgeführt:

### **1.10.1. Genom-basierte Analysen von Tier- und Lebensmittel-assoziierten *Klebsiella* spp.-Isolaten aus Deutschland**

Im Zeitraum von 2014 bis 2017 wurden vom BfR Tier- und Lebensmittel-assoziierte *Klebsiella* spp.-Isolate gesammelt sowie eine Speziesidentifizierung mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie, eine Antibiotikaempfindlichkeitstestung und eine Ganzgenom-Sequenzierung (Illumina-Verfahren) vorgenommen. Die Sequenz-Daten wurden im Rahmen des GOHI Projektes dem RKI übermittelt. In der vorliegenden Arbeit sollten anhand dieser Genom-Daten die *Klebsiella*-Phylogruppen differenziert und Kapseltypen, Resistenzgene sowie Virulenzfaktoren ermittelt werden. Für Isolate des *K. pneumoniae sensu lato* Komplexes sollten anschließend mittels MLST-Analysen die Sequenztypen für darauf aufbauende phylogenetische Analysen bestimmt werden. Ziel dieser Studie war es, einen Überblick über die Verteilung von *Klebsiella*-Phylogruppen in Tieren und Lebensmitteln in Deutschland zu erhalten. Weiterhin sollten mögliche tierische Reservoirs human-assoziiierter, nosokomialer und hypervirulenter Stammvarianten identifiziert werden.

### **1.10.2. Genom-basierte Analysen von hypervirulenten *K. pneumoniae*-Isolaten aus Deutschland**

In Deutschland sind Infektionen durch hvKp in der Literatur bisher nur zwei Mal beschrieben worden [54, 140]. Da in Routinelaboratorien nur selten eine differenzierte Diagnostik über die



Speziesidentifikation und die Resistenzbestimmung hinaus erfolgt, ist die tatsächliche Zahl der hvKp-Infektionen wahrscheinlich wesentlich höher. Im Rahmen dieses Teilprojekts sollten daher hypervirulente *K. pneumoniae* aus Deutschland identifiziert und charakterisiert werden. In Zusammenarbeit mit Diagnostiklaboren wurden invasive und hypermukovisköse *K. pneumoniae*-Isolate gesammelt, welche mittels Multiplex-PCR auf das Vorhandensein der Gene *rmpA*, *rmpA2* oder den Serotyp K1 selektiert wurden. Die so ausgewählten Isolate wurden anschließend mittels Illumina Technologie sequenziert. Anhand der Ganzgenom-Daten sollten Sequenz- und Kapseltypen sowie vorhandene Resistenz- und Virulenzgene detektiert werden. Ziel dieses Teilprojekts war es Aussagen über die Populationsstruktur hypervirulenter Linien in Deutschland treffen zu können.

#### **1.10.3. Funktionelle Analysen von *K. pneumoniae* zur Erfassung einer möglichen Wirtsassoziation, Wirtsadaption und Auswirkungen auf die Virulenz und Antibiotikaresistenz**

Im Jahr 2009 beschrieb die Gruppe um Sahley *et al.*, dass der Erwerb von ESBL-kodierenden Plasmiden mit einer erhöhten Fimbrienexpression und einer gesteigerten Adhäsion an Epithelzellen assoziiert ist [141]. In diesem Teilprojekt sollte nun die Pathogen-Wirts-Interaktion von verschiedensten *K. pneumoniae*-Isolaten humanen und tierischen Ursprungs im Zellkulturmodell untersucht werden. Dazu sollte in Infektionsexperimenten die Adhäsions-, Invasions- und Replikationsfähigkeit sowie die Phagozytoseresistenz von Antibiotika-sensiblen cKp, ESBL-bildenden cKp (ESBL-cKp) und hvKp-Isolaten verglichen werden. Die Zellassays sollten unter Normoxie und Hypoxie-Bedingungen durchgeführt werden. Des Weiteren sollte im Rahmen eines Forschungsaufenthaltes am Paul-Ehrlich-Institut die Widerstandsfähigkeit und das Wachstum in Thrombozytenkonzentraten und in humanen Seren untersucht werden. Ziel war es, mögliche Wirtsassoziationen von *K. pneumoniae* zu identifizieren sowie Aussagen über Wirtsadaptation unterschiedlicher Pathotypen zu treffen, die zu deren erfolgreicher Verbreitung beitragen.

#### **1.10.4. Generierung und Charakterisierung einer *rmpA*-Deletionsmutante**

Hypermukoviskosität und Hypervirulenz werden mit der Präsenz des *rmpA*-Gens assoziiert [142]. In Mausmodellen konnte nach der Infektion mit *rmpA* positiven (*rmpA*<sup>+</sup>) *K. pneumoniae*-Isolaten

bereits eine gesteigerte Mortalität und Abzessbildung beobachtet werden [143]. Im Rahmen dieses Teilprojektes sollte daher der Einfluss des Virulenzfaktors *rmpA* auf die Zellmorphologie und die Pathogen-Wirts-Interaktion von *K. pneumoniae*-Isolaten humanen und tierischen Ursprungs untersucht werden. Dafür sollte eine *rmpA*-Deletionsmutante ( $\Delta rmpA$ ) konstruiert und mit dem Wildtyp im Zellkulturmodell verglichen werden. Des Weiteren sollte ein *rmpA*<sup>+</sup> cKp-Isolat tierischen Ursprungs generiert und mit dem entsprechenden *rmpA*<sup>-</sup> Wildtyp verglichen werden. Ziel dieser Untersuchungen war es, den Einfluss von *rmpA* auf die Invasion und Phagozytoseresistenz von *K. pneumoniae*-Isolaten unterschiedlichen Ursprungs zu untersuchen. Die daraus resultierenden Erkenntnisse sollen zu einem besseren Verständnis der Pathogenese von hvKp-Isolaten beitragen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Chemikalien

In Tabelle 1 sind die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und deren Hersteller zusammengefasst.

**Tabelle 1: Übersicht verwendeter Chemikalien und deren Hersteller**

Bezeichnung	Hersteller
Aceton	Carl Roth GmbH & Co. KG
Agar	Merck KGaA
Agarose	Promega
Amikacin	Sigma-Aldrich GmbH
Ampicillin	Sigma-Aldrich GmbH
Borsäure	SERVA electrophoresis GmbH
BSA (Rinderserum Albumin)	PAA
Cefotaxim	Sanofi-Aventis GmbH
Cefoxitin	Sanofi-Aventis GmbH
Ceftazidim	Sanofi-Aventis GmbH
Chloramphenicol	Sanofi-Aventis GmbH
Ciprofloxacin	Fluka Chemie GmbH
Colistin	Mast Diagnostics GmbH
2,6-Diaminopimelinsäure (DAP)	Sigma-Aldrich GmbH
DNA Gel Loading Dye (6X)	Thermo Fisher Scientific, Inc
DMEM, high Glucose, with L-Glutamine	GE Healthcare
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Thermo Fisher Scientific, Inc
dNTP, Nukleotid Mix 10 mM	Bioline
D-PBS Dulbecco's PBS (10x)	GE Healthcare
Ethanol	Merck KGaA
Ethidiumbromid	Merck KGaA
FKS (Fötales Kälberserum)	PAA
GeneRuler 100 bp	Thermo Fisher Scientific, Inc
GeneRuler 1kb Ladder plus	Thermo Fisher Scientific, Inc
Gentamicin	Sanofi-Aventis GmbH
Kanamycinmonosulfat	Sigma-Aldrich GmbH
Meropenem	Sigma-Aldrich GmbH
Mucasol	Brand
Nalidixinsäure	Sigma-Aldrich GmbH
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG
Natriumpyruvat	GE Healthcare
Nukleasefreies Wasser (ddH <sub>2</sub> O)	Thermo Fisher Scientific, Inc
Oxytetrazyklin	Sigma-Aldrich GmbH
Streptomycin	Sigma-Aldrich GmbH
Penicillin/Streptomycin	GE Healthcare
Sulbactam	Sanofi-Aventis GmbH
Sulfmethoxazol/Trimethoprim (SXT)	Sigma-Aldrich GmbH
RPMI 1640	Thermo Fisher Scientific, Inc
Tris Base	Sigma-Aldrich GmbH
Tris-HCl	Merck KGaA
Trypanblau	Sigma-Aldrich GmbH

## 2.2. Enzyme

In Tabelle 2 sind die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Enzyme und deren Hersteller zusammengefasst.

**Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Enzyme und deren Hersteller**

Bezeichnung	Hersteller
Antarctic Phosphatase	New England Biolabs
Antarctic Phosphatase Puffer	New England Biolabs
Accutase	GE Healthcare
BamHI	New England Biolabs
DNase	New England Biolabs
DpnI	New England Biolabs
DreamTaq Polymerase	Thermo Fisher Scientific, Inc
EcoRV	New England Biolabs
KAPA2G Robust HotStart Polymerase	Sigma-Aldrich GmbH
NdeI	New England Biolabs
Lysozym	Sigma-Aldrich GmbH
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase	Thermo Fisher Scientific, Inc
Proteinase K	Omega Bio-Tek
RNase	Thermo Fisher Scientific, Inc
Sall	New England Biolabs
T4 Polynukleotid Kinase	New England Biolabs
T4 Polynukleotid Kinase Puffer	New England Biolabs
T4 DNA Ligase	New England Biolabs
XbaI	New England Biolabs
XhoI	New England Biolabs

## 2.3. Geräte

In Tabelle 3 sind die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Geräte und deren Hersteller zusammengefasst.

**Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Geräte und deren Hersteller**

Geräte	Bezeichnung	Firma
Absorptionsmessgeräte	Tecan Sunrise	Tecan
	Tecan Infinite M1000	Tecan
	Go	Thermo Fisher Scientific, Inc,
	Sky	Thermo Fisher Scientific, Inc,
Brutschränke	B20	Heraeus
	Heracell 240	Heraeus
Destillationssystem	MilliQ Advantage A10	Merck Millipore
Kultur Rotator	Roler Drum	New Brunswick Scientific
Elektroporationsgerät	Cell Porator	Life technologies
Elektrophoresekammer	Sub-Cell GT	Bio-Rad Laboratories, Inc
Fluorometer	Qubit 3.0	Thermo Fisher Scientific, Inc
Geldokumentation	GelDoc XRS	Bio-Rad Laboratories, Inc

Geräte	Bezeichnung	Firma
Heizschüttler	Thermomixer	Eppendorf AG
Inkubatoren	BacT/ALERT	Biomérieux
	Innova 42/42R	New Brunswick Scientific
Kamera	EOS 450D S	Canon
Koloniezählgerät	Acolyte	Synbiosi
Mikroskope	Axiovert 40 cfl	Carl Zeiss Jena
	IMT	Olympus
	Ti-E	Nikon
Mikrowelle	Severin	Carl Roth GmbH & Co. KG
PCR-Cycler	Thermocycler T-Gradient	Biometra
	7500 Real-time PCR System	Applied Biosystems
Pipetten	Multipipette Research pro	Eppendorf AG
	Reference variabel	Eppendorf AG
Plattiergerät	Whitley Spiral Plater	Meintrup DWS
Pulsfeldgelelektrophorese	Chef-DRIII System	Bio-Rad Laboratories, Inc.
	Cooling Module	Bio-Rad Laboratories, Inc.
	Electrophoresis Cell	Bio-Rad Laboratories, Inc.
	Variable Speed Pump	Bio-Rad Laboratories, Inc.
Spannungsquelle	Power Pack Basic	Bio-Rad Laboratories, Inc.
Sterilbank	Herasafe	Heraeus
UV/VIS Spektrophotometer	Eppendorf Biophotometer Plus	Eppendorf AG
UV-Transilluminator	Gel Doc 2000	Bio-Rad Laboratories, Inc.
Vortex Mixer	Vortex Mixer 7-2020	neoLab
Waagen	CP64	Sartorius Lab instruments GmbH&Co KG
	1212 MP	Sartorius Lab instruments GmbH&Co KG
	Kern 440-43N	Sartorius Lab instruments GmbH&Co KG
Wasserbad	Aqualine AL 5	Lauda
Zentrifugen	5415R	Eppendorf AG
	Sorvall RC-5	Du Pont Instruments
	Labofuge400	Heraeus
	5810R	Eppendorf AG
	Avanti™ Centrifuge J-25	Beckman Coulter
	Mini Centrifuge	Nippon Genetics Europe GmbH

## 2.4. Kits

In Tabelle 4 sind die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Kits und deren Hersteller zusammengefasst.

**Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Kits**

Kit	Hersteller
Agilent High Sensitivity DNA Kit	Agilent Technologies, Inc.
Cryobank™ Kryoröhrchen	Mast Diagnostica GmbH
DNeasy Blood & Tissue Kit	QIAGEN GmbH
DreamTaq Green PCR Master Mix 2x	Thermo Fisher Scientific, Inc.
DreamTaq PCR Master Mix 2x	Thermo Fisher Scientific, Inc.
GeneJet PCR PGeneJet	Thermo Fisher Scientific, Inc.
KAPA2G Robust HotStart ReadyMix	Sigma-Aldrich GmbH
LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity Kit, for mammalian cells	PYROTELL-T

Kit	Hersteller
MagAttract HMW DNA Kit	QIAGEN GmbH
Nextera® DNA Library Preparation Kit	New England Biolabs
Nextera® Index Kit	Illumina, Inc.
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up	Macherey Nagel
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase	Thermo Fisher Scientific, Inc
Qubit™ dsDNA HS Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Inc.

## 2.5. Lösungen und Puffer

In Tabelle 5 sind die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Puffer und Lösungen sowie deren Zusammensetzung zusammengefasst.

**Tabelle 5: Übersicht der verwendeten Puffer und Lösungen**

Bezeichnung	Zusammensetzung
Cell Suspension Buffer (CSB) – PFGE, pH 8,0	100 mM Tris 100 mM EDTA
6x DNA-Probenpuffer	60 mM EDTA 10 mM (pH 7,6) Tris-HCl 0,03 % (w/v) Bromphenolblau 0,03 % (w/v) Xylencyanol 60 % (v/v) Glycerol
Ethidiumbromid-Stammlösung PAS-II	0,5% Ethidiumbromid 115,5 mM/l NaCl 10 mM/l Na-Citrat 30 mM/l Na-Acetat
10x TRIS-Acetat-EDTA-Puffer (TAE)-Puffer	2 M Tris Base 1 M Eisessig 0,1 M Na <sub>2</sub> EDTA
10x Tris-Borat-EDTA (TBE)-Puffer	2 M Tris-Base 20 mM EDTA 890 mM Borsäure

## 2.6. Materialien

In Tabelle 6 sind die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Materialien und deren Hersteller zusammengefasst.

**Tabelle 6: Übersicht der verwendeten Materialien und deren Hersteller**

Bezeichnung	Hersteller
Kryo-Gefäße	Carl Roth GmbH & Co. KG
Deckgläser, rund	VWR
Elektroporationsküvetten	Whatman
Filter	BD Bioscience
Glasröhrchen	Shott
Impfösen	VWR
Kanülen	B.Braun

Bezeichnung	Hersteller
Küvetten (NanoPhotometer® C40)	Implem
Mikrotiterplatten 96-well	Anicrin
Neubauerzählkammer	Carl Roth GmbH & Co. KG
Pasteur-Pipetten	VWR
PCR Tubes	Greiner bio-one
Objektträger	Carl Roth GmbH & Co. KG
Reaktionsgefäße 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf AG
Reaktionsgefäße 15 ml, 50 ml	Eppendorf AG
Serologische Pipetten	Neo-Lab
Spritze (1 ml, 5 ml, 10 ml, 50 ml)	B. Braun
Transfusionsbeutel	BD Bioscience
Objektträger	VWR
Zellkulturflaschen (25 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup> )	Nunc
Zellkulturplatten	24-well Cellstar, Greiner bio-one
Zellschaber	VWR

## 2.7. Medien

In Tabelle 7 sind die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Medien und deren Zusammensetzung zusammengefasst. Die Sterilisation der Medien erfolgte wie angegeben entweder durch Autoklavieren bei 121°C, 1 bar für 15 min oder durch Sterilfiltration (0,2 µm Porengröße). Für die Herstellung von Festmedien wurden 1,5 % (w/v) Agar zugegeben. Antibiotika und Glukose wurden jeweils steril filtriert und erst nach dem Autoklavieren zugesetzt.

**Tabelle 7: Übersicht der verwendeten Medien und deren Zusammensetzung**

Bezeichnung	Zusammensetzung
BHI-Bouillon	37 g BHI Bouillon ddH <sub>2</sub> O ad. 1 l und autoklaviert
BHI-Agar	1 l BHI Bouillon 10 g Agar
Gallsäure-Chrysoidin-Glycerol-(GCG)- Selektions Agar	Sifin Diagnostics GmbH
Luria-Bertani (LB) Agar	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl 15 g Agar ddH <sub>2</sub> O ad. 1 l und autoklaviert
Luria Bertani (LB) Bouillon	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl ddH <sub>2</sub> O ad. 1 l und autoklaviert
Müller-Hinton (MH) Agar	Oxoid GmbH
Müller-Hinton (MH) Agar mit Schafblut	Oxoid GmbH
PBS Puffer (pH 7,2)	0,2 g KCl 0,2 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1,15 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 8 g NaCl ddH <sub>2</sub> O ad. 1 l

Bezeichnung	Zusammensetzung
SOB-Medium (Super Optimal Broth-Medium)	20 g Trypton 5 g Hefeextrakt 0,584 g NaCl 0,186 g KCl ddH <sub>2</sub> O ad. 1 l und autoklaviert
SOC-Medium (Super Optimal Broth-Derivat)	98 ml SOB-Medium 1 ml 2 M Mg <sup>2+</sup> Stammlösung (20,33 g MgCl <sub>2</sub> × H <sub>2</sub> O und 24,65 g MgSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O je 100 ml Stammlösung); autoklaviert 1 ml 2 M Glukose Stammlösung (36,04 g Glukose je 100 ml Stammlösung); sterilfiltriert

## 2.8. Plasmide

In Tabelle 8 sind die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Plasmide zusammengefasst.

**Tabelle 8: Übersicht der verwendeten Plasmide**

Bezeichnung	Beschreibung	Referenz/Hersteller
pFOK*	<i>aph, l-secl, oriT, P<sub>tetA</sub>, R6K<sub>y</sub> ori, sacB, tetR, traJ</i>	Cianfanelli et al. 2020 [144]
pCR™-Blunt II-TOPO®*	<i>P<sub>lac</sub>, lacZα, ccdB, kan, zeocin, pUK ori</i>	Thermo Fisher Scientific, Inc
pWKK1	<i>ΔrmpA, Km<sup>R</sup></i>	diese Arbeit
pWKK3	<i>P<sub>rmpA</sub>::rmpA, Km<sup>R</sup></i>	diese Arbeit

## 2.9. Primer

In Tabelle 9 sind die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotid-Primer, deren Sequenzen mit Hilfe der Software *Clone Manager Professional* (Sci-Ed Software) konstruiert wurden, zusammengefasst. Die Oligonukleotide wurden in lyophilisierter Form von der Firma IDT bezogen. Sofern nicht anders angegeben, wurden die Oligonukleotide nach den Herstellerangaben rekonstituiert (100 µM).

**Tabelle 9: Übersicht der verwendeten Primer**

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'	Produkt (bp)	Verwendung
magA-F	GGTGCTCTTTACATCATTTGC	1283	Multiplex Screening
magA-R	GCAATGGCCATTTGCGTTAG		Multiplex
rmpA-F	ACTGGGCTACCTCTGCTTCA	535	Multiplex
rmpA-R	CTTGCATGAGCCATCTTTCA		Multiplex
rmpA2-F	TTATGTGCAATAAGGATGTT		Multiplex
rmpA2-R	CTAGGTATTTGATGTGCAC	620	Multiplex
pFOK-EcoRI-FR1-rmpA-for	GAGGTCGACGGTATCGATAAGCTTGATA- TCGAATTCAGGGTTAAGATCCATGAG	700	Gibson Assembly
pFOK-FR1-rmpA-rev	AAAACAATAAATAAATGAAAGAGTGCTTTCA- CCCCCTTGTCCTTTGCGTGTTC		Gibson Assembly
pFOK-FR2-rmpA-for	GGGGTGAAAGCACTCTTTCATTTAT	694	Gibson Assembly



Bezeichnung	Sequenz 5'-3'	Produkt (bp)	Verwendung
pFOK-FR2-BamHI-rmpA-rev	GGATCCACTAGTTCTAGAGCGGCCGCCAC- CGCGGTCTTTAGAATTAGGATAGCCTCGTGT		Gibson Assembly
oOPC-614	GCTACCTGCTTTCTCTTTGCGCTTGC	1589	Verifizierung
oOPC-615	TATGACCATGATTACGCCAAGCGCGC		Verifizierung
rmpA-del-check-for	GGGAAACTGTCACGACAATG	1687	Verifizierung
rmpA-del-check-rev	TAGCCTCGTGTGCGTCAATG		Verifizierung
M13-FP	CTGGCCGTCGTTTTAC	1017	Verifizierung
M13-RP	TCATAGCTGTTTCCTG		Verifizierung

## 2.10. Software

In Tabelle 10 sind die im Rahmen dieser Arbeit verwendete Software zusammengefasst.

**Tabelle 10: Übersicht der verwendeten Software**

Bezeichnung	Version	Hersteller/Referenz
CFX Maestro	4.1	Bio-Rad Laboratories, Inc.
Clone Manager Professional 9	9.51	Sci Ed Software, USA
CorelDRAW x6	16.2.0.998	Corel Corp.
Easyfig	2.2.2	Sullivan <i>et al.</i> , 2011 (151)
EndNote	X7.7.1	Thomson Reuters
FastQC	0.11.5	Babraham Bioinformatics Group
Geneious	2020.2.3	Biomatters Limited, Auckland, Neuseeland, Kears <i>et al.</i> , 2012
Image Lab	6.0.25	Bio-Rad Laboratories, Inc.
iTOL	5.6.3	<a href="https://itol.embl.de/">https://itol.embl.de/</a> , Letunic and Bork, 2016
Kaptive	0.5.1	<a href="https://github.com/katholt/Kaptive">https://github.com/katholt/Kaptive</a>
Kleborate	0.4.0-beta	<a href="https://github.com/katholt/Kleborate">https://github.com/katholt/Kleborate</a>
Mauve	2.3.1	Darling <i>et al.</i> , 2004
Microsoft Office	2019	Microsoft Corporation, USA
MikrobeJ	5.13l	Ducret <i>et al.</i> , 2016
Nikon NIS-Elements AR Software		Nikon
Notepad++	7.8.5.1	<a href="https://notepad-plus-plus.org">https://notepad-plus-plus.org</a>
Prokka	1.13.3	Seemann, 2014
ResFinder	4.0	Bortolaia <i>et al.</i> , 2020
RefRank	1.0.0	<a href="https://gitlab.com/s.fuchs/refRank">https://gitlab.com/s.fuchs/refRank</a>
Ridom SeqSphere	v7.1.0	Ridom GmbH
Skant	6.0.1.6	Thermo Fisher Scientific, Inc
SNPFilter	2.2.0	Becker <i>et al.</i> , 2018
SPAdes	3.13.1	Nurk, Bankevich <i>et al.</i> , 2013 Antipov <i>et al.</i> , 2015.
Trimmomatic	0.0.9	Bolger <i>et al.</i> , 2014
Unicycler	v0.4.8	Wick <i>et al.</i> , 2017

## **2.11. Methoden**

### **2.11.1. Kultivierung von *K. pneumoniae***

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle in dieser Arbeit verwendeten *K. pneumoniae*-Isolate der Stammsammlung der Arbeitsgruppe Multiresistente Gram-negative Erreger des Fachgebiets 13 des Robert Koch-Institutes in Wernigerode entnommen. Die Stämme wurde mit einer Datenbanknummer versehen, die sich aus dem Jahr und der laufenden Eingangsnummer des eingesandten Isolats zusammensetzt.

Alle eingehenden Isolate wurden auf Galle-Chrysoidin-Glycerol (GCG)-Agar und Müller-Hinton (MH)-Agar mit 3% Schafblut ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am Folgetag wurden die Isolate auf Kontaminationen geprüft und bei Bedarf wurden Vereinzelungen vorgenommen. Von allen Stämmen wurde, wie in 2.11.3 beschrieben, eine Kryokultur angelegt.

Für nachfolgende Analysen wurden die Kryokulturen, wenn nicht anders beschrieben, mit einer Impföse auf MH- oder Luria Bertani (LB)-Agar ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Die Kultivierung in Flüssigmedium erfolgte in BHI- oder LB-Medium. Dazu wurden 3 ml des entsprechenden Mediums mit einer Kolonie des gewünschten Isolats inokuliert und im horizontalen Rotationsinkubator über Nacht bei 37°C kultiviert.

In Tabelle 11 sind die verwendeten *K. pneumoniae*-Stämme zusammengefasst.

### **2.11.2. Kultivierung von *E. coli***

Die Kultivierung der verwendeten *E. coli*-Stämme erfolgte aus Kryokulturen auf LB-Agar bei 37°C über Nacht. Wenn erforderlich, wurden dem Medium zur Selektion entsprechende Antibiotika zugesetzt. Abhängig von den sich anschließenden Versuchen erfolgte die Anzucht einer Flüssigkultur in Glasröhrchen oder in Erlenmeyerkolben verschiedener Volumina schüttelnd bei 37°C in LB-Medium.

In Tabelle 11 sind die verwendeten *E. coli*-Stämme zusammengefasst.

**Tabelle 11:** Übersicht der verwendeten *K. pneumoniae*- und *E. coli*-Stämme

Bezeichnung	Genotyp	Herkunft/Referenz
<b><i>K. pneumoniae</i>-Stämme</b>		
ATCC183883	Wildtyp	LGC Standards GmbH
ATCC700721	Wildtyp	LGC Standards GmbH
NCTC14052	Wildtyp	Public Health England
PEI-BP-08	Wildtyp	Paul-Ehrlich-Institut [145]
16-0382	Klinisches Isolat	diese Arbeit
16-0383	Klinisches Isolat	diese Arbeit
17-0609	Klinisches Isolat	[146]
17-0683	Klinisches Isolat	diese Arbeit
17-0684	Klinisches Isolat	diese Arbeit
17-0736	Klinisches Isolat	diese Arbeit
18-0005	Klinisches Isolat	diese Arbeit [147]
18-0014	Klinisches Isolat	diese Arbeit
18-0414	Klinisches Isolat	diese Arbeit
19-0036	Klinisches Isolat	diese Arbeit
19-0213	Klinisches Isolat	diese Arbeit
WKK1	17-0736 $\Delta rmpA$	diese Arbeit
WKK2	17-0736 $P_{rmpA}::rmpA$	diese Arbeit
WKK3	18-0014 $P_{rmpA}::rmpA$	diese Arbeit
<b><i>E. coli</i>-Stämme</b>		
12-0346 (K2)	<i>E. coli</i> J53 Azi <sup>r</sup> transconjugant, $bla_{OXA-48}$ , IncL/M-1	[148]
13-0384 (K2)	<i>E. coli</i> J53 Azi <sup>r</sup> transconjugant, $bla_{NDM-1}$ , $bla_{CTX-M-15}$ , $bla_{OXA-9}$ , $bla_{TEM-1}$ , IncFII	[148]
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> <i>endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG purB20</i> $\phi 80dlacZ\Delta M15 \Delta(lacZYA-argF)U169$ , $hsdR17(r_K^- m_K^+)$ , $\lambda^-$	Thermo Fisher Scientific, Inc
<i>E. coli</i> MG1655	K-12 F <sup>-</sup> $\lambda^-$ <i>ilvG- rfb-50 rph-1</i>	Dr. Roman Gerlach
<i>E. coli</i> JKE201	genotype: MG1655 RP4-2-Tc::[ $\Delta Mu1::\Delta aac(3)IV::lacIq-\Delta aphA-\Delta nic35-\Delta Mu2::zeo$ ] $\Delta dapA::(erm-pir) \Delta recA \Delta mcrA \Delta(q)$ [	[149]

### 2.11.3. Kryokonservierung

Zur Langzeitaufbewahrung der *K. pneumoniae*- und *E. coli*-Stämme wurden Glyzerolgefrierkulturen angelegt. Dazu wurden Cryobank Kryoröhrchen (Mast Diagnostica GmbH) mit Reinkulturen nach Herstellerangabe beimpft und bei -80°C gelagert.

### 2.11.4. Phänotypische Resistenztestung

Die antimikrobiellen Empfindlichkeitstestungen wurden anhand eines standardisierten Mikrobouillondilutionsverfahrens in Mikrotiterplatten (96-Kavitäten) nach EUCAST Kriterien sowie automatisiert mittels VITEK 2 nach Herstellervorgaben unter Verwendung der Testkarte AST-N248 durchgeführt.

### 2.11.5. Lichtmikroskopie

Zur Lichtmikroskopie der Zellmorphologie verschiedener *K. pneumoniae*-Stämme wurden diese bis zur stationären Wachstumsphase bei 37°C kultiviert. Von der Bakterienkultur wurde 1 ml bei 14.000 Upm für 5 min. zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml Kristallviolettlösung (50 µl Kristallviolett + 950 µl PBS) resuspendiert und 1 min inkubiert. Anschließend wurde die Kultur erneut zentrifugiert und das Zellpellet in PBS gewaschen. Die Bakteriensuspension wurde im Verhältnis 1:2 mit einer 60%igen Tuschelösung (in PBS) versetzt. Von der Tuschefärbung wurden 0,2 µl auf einem mit 1,5%iger Agarose (in PBS) beschichteten Objektträger gegeben und mit einem Deckglas abgedeckt. Im Phasenkontrast des Nikon Eclipse Ti Mikroskops wurde die Zellmorphologie der Bakterienzellen unter einem 100× Ölimmersionsobjektiv untersucht und die Bilder über eine Nikon DS-MBWc CCD-Kamera aufgenommen. Zur Bestimmung der Zelllängen wurden in Triplikaten 100 Bakterienzellen pro Stamm mit Hilfe des Programms *MicrobeJ* vermessen.

### 2.11.6. Anzucht von Zellkulturen

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien der Stammsammlung des Robert Koch-Instituts in Wernigerode entnommen. Die Zellen wurden in mit 10% DMSO versetztem Kulturmedium (DMEM bzw. RPM) in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Zur Anzucht wurden die eingefrorenen Zellen bei 37°C im Wasserbad aufgetaut, anschließend in Kulturmedium mit 10% FKS suspendiert, in Zellkulturflaschen (25 cm<sup>2</sup>) ausgesät und bei 37°C unter 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Zur Passagierung der Zellen wurden adhärente Zellen (A549, HuTu80, RAW 264.7) mittels Zellschaber oder durch die Zugabe von 1 ml Accutase (100%) 5 min bei 37°C vom Boden der Kulturflaschen gelöst und in Kultur gebracht. Das Splitverhältnis der einzelnen Zelllinien ist der Tabelle 12 zu entnehmen.

**Tabelle 12: Übersicht der verwendeten Zelllinien**

Bezeichnung	Medium	Ratio	Herkunft
A549-Lungenzellen	RPMI 1640, 10% FKS	1:4	ATCC CCL-185
HuTu80-Darmzellen	DMEM, high Glucose, Natriumpyruvat with L-Glutamine, 10% FKS	1:5	Cell Line Service
RAW 264.7	RPMI 1640, Natriumpyruvat, 10% FKS	1:6	ATCC TIB-71™
HT29-MTX	DMEM, high Glucose, Natriumpyruvat with L-Glutamine, 10% FKS	1:5	Prof. Guntram Graßl, Hannover

Anschließend wurden die Zellen in eine frische Zellkulturflaschen (75 cm<sup>2</sup>) passagiert. Die Zellkulturen wurden in den für die jeweilige Zelllinie erforderlichen Intervallen regelmäßig passagiert.

### **2.11.7. Molekularbiologische Arbeiten**

#### **2.11.7.1. DNA-Isolierung**

In Abhängigkeit von den sich anschließenden Analysemethoden und deren Anforderungen an DNA-Qualität wurden verschiedene DNA-Extraktionsmethoden angewendet die im Folgenden genauer beschrieben werden.

#### **2.11.7.2. Koch-DNA**

Für das generelle PCR Screening wurde „Koch-DNA“ isoliert. Hierfür wurden 100 µl mit ca. 10 Bakterienkolonien einer Reinkultur inokuliert und für 10 Minuten bei 96°C inkubiert. Abschließend wurde der Ansatz für 10 min bei 10.000 Upm zentrifugiert und der DNA-haltige Überstand für PCR-Analysen verwendet. Die DNA-Proben wurden bei -20°C gelagert.

#### **2.11.7.3. DNeasy Blood & Tissue Kit**

Die DNA-Extraktion mittels des DNeasy Blood & Tissue Kits (Qiagen GmbH) erfolgte nach Angaben des Herstellers für Gram-negative Bakterien. Die DNA wurde zweimal in 50 µl Nuklease-freiem Wasser eluiert. Im Anschluss wurde die DNA-Konzentration, wie unter 2.11.8.2 beschrieben, ermittelt.

#### **2.11.7.4. MagAttract HMW DNA Kit**

Die DNA-Extraktion mittels des MagAttract HMW DNA Kits (Qiagen GmbH) erfolgte nach Angaben des Herstellers für Gram-negative Bakterien.

#### **2.11.7.5. NucleoSpin Gel and PCR Clean-up**

Die DNA-Reinigung mittels des NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kits (Macherey Nagel) erfolgte nach Angaben des Herstellers. Im Anschluss wurde die DNA-Konzentration, wie unter 2.11.8.2 beschrieben, ermittelt.

### 2.11.7.6. Plasmid-Isolation

Die Isolation von Plasmiden erfolgte mittels des GeneJet Plasmid Miniprep Kits (Thermo Fisher Scientific, Inc.) nach Herstellerangaben. Anschließend erfolgte eine Überprüfung des Extraktionsprodukts wie unter 2.11.8.6 beschrieben mittels Agarose-Gelelektrophorese. Die Plasmid-DNA wurde bei -20°C gelagert.

### 2.11.8. DNA-Techniken

#### 2.11.8.1. Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerase Kettenreaktion ist es möglich, selektiv DNA-Fragmente *in vitro* zu amplifizieren. In der vorliegenden Arbeit wurde die PCR für analytische und präparative Methoden eingesetzt. Für analytische PCR-Ansätze wurden die DreamTaq DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Inc.) und die KAPA2G Polymerase (Sigma-Aldrich GmbH) verwendet. Für präparative Ansätze wurde die Phusion High Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Inc.) verwendet. Die PCR-Protokolle sind wie vom Hersteller angegeben verwendet und die Annealing-Temperatur entsprechend der verwendeten Primerpaare (Tabelle 9) angepasst worden. Weiterhin wurde die Extensions-Zeit entsprechend der Größe des zu erwartenden PCR-Produkts modifiziert.

In einer Multiplex PCR wurden klinische *K. pneumoniae*-Isolate auf das Vorhandensein der Gene für Kapselsynthese-Regulatoren (*rmpA*, *rmpA2*) und des Kapseltyps K1 (*magA*) untersucht. Dafür wurden angepasste Primerkonzentrationen eingesetzt und die in den Tabellen 13 und 14 zusammengefassten Parameter gewählt:

**Tabelle 13: Multiplex PCR Ansatz**

Reagenz	Menge
Dream Taq PCR Master Mix 2x	12,5 µl
Primer <i>magA</i> F/R*	je 0,1 µL
Primer <i>rmpA2</i> F/R*	je 0,3 µL
Primer <i>rmpA</i> F/R*	je 0,4 µL
DNA	ca. 10 ng
Nukleasefreies ddH <sub>2</sub> O	ad 25 µl

\*Primerstammlösung 10 µM

**Tabelle 14: Multiplex PCR-Bedingungen**

Schritt	Temperatur	Zeit	
Initialdenaturierung	95°C	15 min	
Denaturierung	94°C	30 s	} 35 Zyklen
Primerannealing	60°C	90 s	
Elongation	72°C	60 s	
Finale Elongation	72°C	10 min	

#### 2.11.8.2. DNA-Qualitäts- und DNA-Konzentrationsbestimmung

Die DNA-Qualität wurden mittels BioPhotometer (Eppendorf AG) und die DNA-Konzentration anhand eines QuBit 4 Fluorometers (Thermo Fisher Scientific, Inc.) mit dem Qubit dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Inc.) nach Herstellerangaben ermittelt.

#### 2.11.8.3. DNA-Restriktionsverdau

Die Restriktion von DNA erfolgte mit Enzymen der Firmen New England Biolabs und Thermo Fisher Scientific Inc. (Tabelle 2). Dazu wurde, wenn nicht anders angegeben, 1 µg DNA mit 1 µl Enzym in einem 30 µl Reaktionsvolumen über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Restriktionsprodukt elektrophoretisch aufgetrennt (siehe 2.11.8.6) und aufgereinigt (siehe 2.11.7.5).

#### 2.11.8.4. Ligation

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte mittels T4-DNA-Ligase (New England Biolabs). Dazu wurden Vektor und Insert-Fragmente im molaren Verhältnis 1:3 unter Zugabe von je 2 µl Ligase und in Ligationspuffer in einem Reaktionsvolumen von 20 µl über Nacht bei 16°C ligiert. Anschließend wurde das Ligationsprodukt zur Transformation in *E. coli* DH5α verwendet.

#### 2.11.8.5. Gibson Assembly

Zur Klonierung eines Suizidplasmides wurde die Methode von *Gibson et al.* angewendet, die es erlaubt, mehrere sich überlappende DNA-Fragmente in einer isothermalen Reaktion zusammenzufügen. Mittels PCR wurden ~700 bp große DNA-Fragmente amplifiziert, die das Zielgen *upstream* und *downstream* flankieren. Die dafür verwendeten Primerpaare (Tabelle 9) wurden so gewählt, dass die resultierenden Fragmente überlappende Sequenzen sowohl untereinander als

auch zum Integrationsvektor enthielten. Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden wie unter 2.11.7.5 beschrieben gereinigt. Anschließend erfolgte mittels *Gibson* Assembly die Verknüpfung auf Basis der überlappenden Sequenzen. Hierfür wurde das *Gibson* Assembly Kit (New England Biolabs) nach Herstellerangaben verwendet. Von dem Reaktionsansatz wurde 5 µl in chemisch-kompetente *E. coli* JKE201 transformiert.

#### **2.11.8.6. Agarose-Gelelektrophorese**

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA, Plasmiden und PCR-Produkten erfolgte, wenn nicht anders angegeben, in einem 1%igen Agarosegel und 1×TAE-Puffer. Die zu untersuchenden Proben wurden mit 0,2 Volumenanteilen Ladepuffer versetzt und bei 100-120 V für 35-50 min aufgetrennt. Anschließend wurde das Agarosegel für 15 min in einem Ethidiumbromid-Bad gefärbt, 15 min in einem Wasserbad gewässert und mittels dem Molecular Imager® Gel DocTM 2000 System dokumentiert. Aus präparativen Gelen wurden Banden der gewünschten Größe mit einem Skalpell ausgeschnitten und die DNA wie unter 2.11.7.5 beschrieben gereinigt.

#### **2.11.9. Sequenziermethoden**

##### **2.11.9.1. Sanger-Sequenzierung**

Neue MLST-Varianten sowie die im Rahmen dieser Arbeit konstruierten Plasmide wurden mittels Sanger-Sequenzierungen verifiziert. Die Sequenzierung wurde durch das Unternehmen Eurofins Biotech AG durchgeführt.

##### **2.11.9.2. Illumina Ganzgenomsequenzierung**

Für die Ganzgenomsequenzierung mittels der Illumina MiSeq-Technologie wurde DNA isoliert (2.11.7.3) und die Konzentration (2.11.8.2) bestimmt (min. 2,5 ng/µl, max 50 ng/µl). Die Sequenzierung wurde von dem RKI-internen Kompetenzzentrum für Sequenzierung durchgeführt.

##### **2.11.9.3. Nanopore MinION Ganzgenomsequenzierung**

Für die Plasmidrekonstruktionen wurden die Ganzgenomsequenzen mittels der MinION Technologie von Oxford Nanopore sequenziert. Dazu wurde DNA isoliert (2.11.7.4) und die Konzentration



(2.11.8.2) bestimmt (Gesamtmenge mindestens 1 µg, Konzentration mindestens 50 ng/µl). Die Sequenzierung wurde von dem RKI-internen Kompetenzzentrum für Sequenzierung durchgeführt.

## **2.11.10. Bioinformatik**

### **2.11.10.1. Qualitätskontrolle von Rohdaten**

Die Qualität der Illumina Rohdaten wurde mittels des Programms *FastQC* (v.0.11.5) (Babraham Bioinformatics) geprüft. Unter der Verwendung von *Trimmomatic* (v. 0.36) wurde die Qualität der Rohdaten durch das Herausfiltern oder Kürzen von Reads (*trimming*) mit schlechten Qualitätsparametern verbessert [150]. Für die anschließenden *de novo* Assemblierungen wurde der Parameter „SLIDINGWINDOW:4:20“ gewählt. Für alle weiteren Parameter wurden die Standardeinstellungen des Programms verwendet.

### **2.11.10.2. *De novo* Assemblierung**

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene *de novo* Assemblierungsprogramme verwendet. *De novo* Assemblierung ist eine Genomrekonstruktion anhand von Genomsequenzen ohne Verwendung einer Referenzsequenz. Die *de novo* Assemblierung von Illumina-Ganzgenomsequenzen wurde unter Verwendung von *SPAdes* (v 3.12.0) durchgeführt. Für Plasmid-Rekonstruktionen wurden MinION *long read* Daten und Illumina *short reads* zusammen mittels der Software *Unicycler* (v.0.4.4) unter Standardeinstellungen assembliert.

### **2.11.10.3. Rekonstruktion der Plasmidsequenzen des *K. pneumoniae*-Isolats 17-0005**

Die Rekonstruktion von Plasmidsequenzen des *K. pneumoniae*-Isolats 17-0005 erfolgte basierend auf dem, wie unter 2.11.10.2 beschrieben, *de novo* assemblierten Genom mit Hilfe des *Geneious Prime* Programms (v. 2020.2.3). Das Assembly ergab drei ringgeschlossene Plasmide. Die rekonstruierten Plasmidsequenzen wurden durch eine *blastn* Analyse auf Ähnlichkeit gegen hinterlegte Nukleotidsequenzen der NCBI GenBank untersucht. Anhand des Ergebnisses wurden die rekonstruierten Plasmidsequenzen und die jeweilige Referenzsequenz in *Geneious* mit Hilfe des *MAUVE Algorithmus* (v.2.3.1, progressive Mauve algorithm, Standardparameter) aligniert.

#### **2.11.10.4. Mapping und SNP-Identifizierung von ST66-K2 *K. pneumoniae*-Isolaten**

Für phylogenetische Analysen von ST66-K2 *K. pneumoniae*-Isolaten wurden *Mapping*-basierte SNP-Analysen durchgeführt. Als Mapping wird eine Genomrekonstruktion anhand von Genomsequenzen unter der Verwendung einer Referenzsequenz bezeichnet. Mit Hilfe des Tools *batchmap* (RKI) wurden die Sequenzen der ST66-K2 *K. pneumoniae*-Isolate prozessiert (Standardparameter) und auf das Referenzgenom *K. pneumoniae* Kp52.145 (FO834906.1) aligniert. Die erstellte Konsensussequenz wurde anschließend mittels *SNPfilter* (v. 2.2.0) auf vorhandene *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) reduziert und ein referenzbasiertes SNP-Alignment erstellt.

#### **2.11.10.5. Berechnung und Visualisierung SNP-basierter Phylogenien**

Das referenzbasierte SNP-Alignment wurde unter Verwendung des Programms *RAXML* (v.8.2.7) mit einem GTR GAMMA Nukleotidmodell (*rapid hill-climbing, 100 starting trees*) zur Ermittlung der phylogenetischen Distanz der *K. pneumoniae* ST66-K2-Isolate ermittelt. Der so berechnete *Maximum-Likelihood*-Baum wurde mittels *iTOL* (v.4.0.3) visualisiert.

#### **2.11.10.6. Genotypisierung anhand von Ganzgenomdaten**

Für die Genotypisierung aller *Klebsiella* spp.-Isolate wurden die *de novo* assemblierten Genomsequenzen mit Hilfe der *Kleborate* Software sowie der Ridom Software *SeqSphere+* (v.4.0.1) ausgewertet und die Eigenschaften der Isolate charakterisiert.

##### **2.11.10.6.1. Multilokus-Sequenztypisierung (*multilocus sequence typing* = MLST)**

Die Multilokus-Sequenztypisierung (MLST) erfolgte mittels *SeqSphere* und *Kleborate*. Beide Programme verwenden die BIGSdb *K. pneumoniae* Spezies Komplex MLST Datenbank des Pasteur-Instituts (<https://bigsdb.pasteur.fr/klebsiella/klebsiella.html>). Anhand der Allelkombinationen werden den Isolaten die entsprechenden Sequenztypen zugeordnet. Neue Allelkombinationen wurden dem Pasteur-Institut übermittelt und neue Sequenztypen vergeben.

#### **2.11.10.6.2. Kerngenom-Multilokus-Sequenztypisierung (cgMLST)**

Die Ermittlung der cgMLST (cg = *core genome*; Kerngenom) wurde mit Hilfe der *SeqSphere+* Software durchgeführt, welche auf Grundlage des BIGSdb *K. pneumoniae* Spezies Komplex cgMLST Schemas die Allelprofile der Isolate ermittelt und diese den entsprechenden Komplextypen (engl. *complex types*, CT) zuordnet. Die so ermittelten Allelprofile wurden anschließend für die Berechnung von Phylogenien (2.11.10.6.3) genutzt.

#### **2.11.10.6.3. cgMLST-basierte Phylogenien**

Anhand der cgMLST-basierten Allelprofile wurden in *SeqSphere+* mit Hilfe des implementierten *neighbor-joining* (NJ) Algorithmus (Standardparameter; *pairwise ignore missing values*) phylogenetische Stammbäume berechnet, die mittels des online-Tools *iToI* visualisiert wurden.

### **2.11.11. Herstellung und Transformation kompetenter *K. pneumoniae* und *E. coli***

#### **2.11.11.1. Herstellung chemisch-kompetenter *E. coli***

Zur Herstellung chemisch-kompetenter *E. coli* wurde eine Übernachtskultur 1:100 in 100 ml LB-Medium verdünnt und schüttelnd bei 37°C bis zu einer optischen Dichte OD<sub>600</sub> 0,5-0,8 kultiviert. Anschließend wurden die Zellen bei 4°C für 5 min bei 6.000 Upm pelletiert. Das Pellet wurde in der Hälfte des Ausgangsvolumens in einer sterilen 0,1 M CaCl<sub>2</sub> Lösung resuspendiert und für 30 min auf Eis gelagert. Es erfolgte erneut ein Zentrifugationsschritt und das Zellpellet wurde anschließend in einem Viertel des Ausgangsvolumens in einer sterilen 0,1 M CaCl<sub>2</sub> Lösung aufgenommen. Die chemisch-kompetenten Zellen wurden direkt zur Transformation verwendet. Zur Langzeitlagerung wurden die chemisch-kompetente Zellen aliquotiert (100 µl) und bei -80°C aufbewahrt.

#### **2.11.11.2. Herstellung elektro-kompetenter *K. pneumoniae***

Ziel ist es kompetente Zellen herzustellen die möglichst salzfrei sind, um via Elektroporation Plasmide transformieren zu können. Dazu wurde eine Übernachtskultur 1:100 in 100 ml LB-Medium verdünnt. Die Kultur wurde bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> 0,5-0,8 kultiviert und anschließend 20 min

auf Eis gestellt. Die Bakterienzellen wurden bei 4°C und 7.000 Upm für 10 min abzentrifugiert und das Pellet im gleichen Volumen eiskaltem Aqua bidest resuspendiert und erneut für 20 min auf Eis gestellt. Im Anschluss erfolgten zwei weitere Waschschrte. Für den ersten Waschschrte wurde das Zellpellet in der Hälfte des Volumens eiskaltem Aqua bidest und für den zweiten Waschschrte in 1/20 des Volumens eiskaltem 10%igen Glycerin aufgenommen. Nach dem letzten Zentrifugationsschrte wurde das Zellpellet in 1/100 des Volumens eiskaltem 10%igen Glycerin aufgenommen und direkt zur Elektroporation verwendet. Zur Langzeitlagerung wurden die elektro-kompetenten Zellen aliquotiert (100 µl) und bei -80°C aufbewahrt.

#### **2.11.12. Transformation von DNA**

Die Transformation ist eine molekularbiologische Technik, um freie DNA ohne die Beteiligung eines Virus in kompetente Bakterienzellen einzuschleusen [151].

##### **2.11.12.1. Hitzeschock Transformation**

Für die Hitzeschock Transformation wurden 50 µl chemisch-kompetente *E. coli* mit 1 µl zu transformierender DNA vermischt und 20 min auf Eis gestellt. Anschließend wurde der Transformationsansatz für 45 Sekunden in einem 42°C warmen Wasserbad inkubiert. Nach einer erneuten zweiminütigen Inkubation auf Eis wurde der Ansatz mit 1 ml SOC-Medium versetzt und 1 h schüttelnd bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden für 3 min bei 5.000 g pelletiert, in 100 µl Medium resuspendiert und auf LB-Agar mit entsprechenden Selektionszusätzen ausplattiert und über Nacht bei 37°C kultiviert.

##### **2.11.12.2. Elektroporation**

Bei der Elektroporation [152] werden Zellmembranen durch das Anlegen eines elektrischen Feldes vorübergehend permeabilisiert. Dazu wurden elektro-kompetente Zellen auf Eis aufgetaut. Die Zellen wurden mit DNA aus Ligationen oder *Gibson Assembly* in eine 2 mm Elektroporationsküvette überführt. Der Ansatz wurde bei 2,5 kV elektroporiert (Bio-Rad Micropulser) und sofort mit SOC-Medium auf 1 ml aufgefüllt. Die Kulturen wurden bei 37°C für 1 h schüttelnd inkubiert.

Anschließend wurden die Kulturen auf Selektivmedien ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert

### **2.11.12.3. Markerfreie chromosomale Deletionen**

Die chromosomale *rmpA*-Deletion in *K. pneumoniae* 17-0736 erfolgte über homologe Rekombination. Dazu wurde das mittels *Gibson Assembly* klonierte Deletionsplasmid pWKK1 von *E. coli* JKE201 in den Rezipientenstamm *K. pneumoniae* 17-0736 konjugiert. Es wurden je 500 µl einer Übernachtskultur des Donors und des Rezipientens gepoolt und 1 min bei 10.000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet wurde in 1 ml LB-Medium ohne Salz resuspendiert und erneut zentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in 100 µl LB-Medium ohne Salz aufgenommen und auf ein Filterpapier auf MH-Agar pipettiert und 6 h bei 37°C inkubiert. Das Filterpapier wurde mit einer sterilen Pinzette in ein 2 ml Eppendorf-Gefäß überführt und die Bakterien mit 1 ml LB-Medium vom Filterpapier gewaschen. Von der Bakteriensuspension wurden 100 µl zur Selektion positiver Konjuganten auf LB-Medium mit 50 µg Kanamycin ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am Folgetag wurden drei Kolonien der Konjuganten in jeweils 2 ml LB-Medium ohne Salz für 90 min schüttelnd bei 37°C inkubiert. Zur negativen Selektion wurden je 50 µl und 100 µl der Bakterienkulturen auf LB-Medium (20% Saccharose; 0,5 µg/ml AHT) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die erzeugten Deletionsmutanten wurden mittels PCR und Sequenzierung überprüft.

## **2.12. Zellinfektionsversuche**

Die Zellinfektionsversuche wurden durchgeführt, um zu untersuchen, ob sich die verschiedenen *K. pneumoniae* Pathotypen in ihrem Adhäsions-, Invasions- bzw. Replikationsvermögen unterscheiden. Dazu wurden stellvertretend für jeden Pathotyp jeweils zwei Isolate aus der RKI-Stammesammlung, für die Ganzgenomdaten vorlagen, ausgesucht und untereinander verglichen. Als Wirtszellen wurden A549-Lungenzellen, RAW 264.7-Mausmakrophagen, HT29-MTX- und HuTu80-Darmzellen verwendet.

### **2.12.1. Adhäsionsassay**

Zur Bestimmung der Adhäsionsrate von *K. pneumoniae*-Isolaten wurden  $3 \times 10^3$  A549-Zellen oder HuTu80-Zellen pro Kavität in 96-Well-Platten ausgesät und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für einen Tag kultiviert. Übernachtskulturen der zu untersuchenden Bakterienstämme wurden in PBS auf eine OD<sub>600</sub> von 0,2 ( $2 \times 10^8$  Bakterienzellen) und anschließend in Zellmedium mit 10% FKS auf die entsprechende MOI (*multiplicity of infection*) eingestellt. Für die Infektionen wurden 100 µl Medium von den Zellen entfernt und durch 100 µl der Bakteriensuspension ersetzt. Nach einem 5-minütigen Zentrifugationsschritt bei 500 Upm erfolgte die Adhäsion der Bakterien während einer einstündigen Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Anschließend wurde das Kulturmedium entfernt und nicht-adhärenente Zellen durch zweimaliges Waschen mit PBS entfernt. Die Zellen wurden mit 100 µl Lyse-Puffer versetzt, von der Zellkulturplatte gelöst und bei 800 Upm, für 20 min bei 24°C lysiert. Zu den Lysaten wurden 100 µl PBS hinzugefügt und eine Verdünnungsreihe in PBS hergestellt, von der je 50 µl auf MH-Agarplatten ausplattiert wurden. Es folgte die Inkubation der beimpften Agarplatten über Nacht bei 37°C.

### **2.12.2. Invasionsassay**

Zur Ermittlung der Invasionsrate von *K. pneumoniae*-Isolaten wurden die Zelllinien wie unter 2.12.1 beschrieben in Mikrotiterplatten infiziert. Abweichend davon wurden die Zellen nach der Infektion mit PBS gewaschen und 1 h in Kulturmedium mit 100 µg/ml Amikazin bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> zur Abtötung extrazellulärer Bakterien inkubiert. Nach 1 h wurde die extrazellulären Bakterien durch das Waschen mit PBS entfernt und die Zellen wie unter 2.12.1 beschrieben lysiert, verdünnt und ausplattiert.

### **2.12.3. Replikationsassay**

Zur Untersuchung der intrazellulären Replikation von *K. pneumoniae* wurde parallel zum Invasionsassay eine weitere Mikrotiterplatte infiziert. Abweichend davon schloss sich nach dem Abtöten und Entfernen extrazellulärer Bakterien eine Inkubation über Nacht mit 10 µg/ml Amikacin an. Anschließend wurden die Zellen wie unter 2.12.1 beschrieben lysiert und Verdünnungsreihen ausplattiert um die Replikationsrate mit dem Invasionsassay als Referenz zu ermitteln.

#### **2.12.4. Zytotoxizitätsassay**

Zur Untersuchung eines zytotoxischen Effekts auf Darmzellen wurden HuTU80-Zellen wie unter 2.12.2 beschrieben mit *K. pneumoniae*-Isolaten infiziert. Abweichend schloss sich nach der Abtötung und dem Entfernen extrazellulärer Bakterien eine Lebend-Tot-Färbung der eukaryotischen Zellen mit Hilfe des LIVE/DEAD™ Viability/Cytotoxicity Kits (Thermo Fischer Inc) nach dem Herstellerprotokoll an.

#### **2.12.5. Wachstumsverhalten in Thrombozytenkonzentraten**

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden klinische *K. pneumoniae*-Stämme bezüglich ihres Wachstumsverhaltens in Thrombozytenkonzentraten untersucht. Dafür wurden die *K. pneumoniae*-Stämme über Nacht schüttelnd bei 37°C in LB-Medium angezüchtet. Am Folgetag wurden Subkulturen in LB-Medium mit einer OD<sub>600</sub> von 0,1 beimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,3 bei 37°C und 120 Upm inkubiert. Von den Bakteriensuspensionen wurde anschließend eine Verdünnungsreihe bis zu 1:100.000 in 0,85% NaCl-Lösung hergestellt, was einer Zellzahl von etwa 10 KBE/ml entspricht. Zur Bestimmung des Inokulums wurde die 10<sup>-5</sup> Verdünnung, mit der die Thrombozytenkonzentrate später gespiked werden, in Triplikaten mittels Spiralplattierer auf LB-Medium ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Thrombozytenkonzentrate wurden in einem sterilen Becherglas zusammengeführt. Als Sterilkontrolle wurden 10 ml der Konzentrate in Blutkulturflaschen der Firma BactAlert überführt und sieben Tage inkubiert. Weiterhin wurden die Thrombozytenkonzentrate in 25 ml Blutbeutel überführt, mit 10 KBE der zu untersuchenden *K. pneumoniae*-Isolate gespiked und 43 h schüttelnd bei 22,5°C inkubiert. Nach den ersten 10 h wurden alle 3 h Proben genommen, verdünnt und in Triplikaten mit einem Spiralplattierer auf LB-Medium ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die letzte Probenentnahme erfolgte nach insgesamt 43 h. Die Bakterienkolonien wurden automatisiert mit der Sphere Flash Apparatur ausgezählt.

#### **2.12.6. Serumresistenz**

Bakterien, die in der Lage sind der Erkennung und Eliminierung durch das Wirts-Komplementsystem zu entgehen, werden als serumresistent bezeichnet. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit

wurden klinische *K. pneumoniae*-Stämme bezüglich ihrer Resistenz gegen menschliches Serum untersucht. Dafür wurden die *K. pneumoniae*-Stämme über Nacht schüttelnd bei 37°C in LB-Medium kultiviert. Am Folgetag wurden Subkulturen in LB-Medium mit einer OD<sub>600</sub> von 0,1 beimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,3 bei 37°C und 120 Upm inkubiert. Von den Bakterienkulturen wurden 2 ml für 5 min bei 10000 Upm pelletiert. Das Zellpellet wurde mit 0,85% NaCl-Lösung gewaschen und erneut für 5 min bei 10000 Upm pelletiert. Dieses Zellpellet wurde erneut in 1 ml 0,85% NaCl-Lösung aufgenommen, was einer Zellzahl von etwa  $2 \times 10^8$  KBE/ml entspricht. Von den Bakteriensuspensionen wurde anschließend jeweils eine Verdünnungsreihe bis 1:100.000 in PAS-II hergestellt, was einer Zellzahl von etwa  $2 \times 10^3$  KBE/ml entspricht. Zur Bestimmung des Inokulums wurde die  $10^{-5}$  Verdünnung, mit der das Human-Serum inokuliert wurde, in Triplikaten mit einem Spiralplattierer auf LB-Medium ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Weiterhin wurden 500 µl der  $10^{-5}$  Verdünnung mit 500 µl 50%igem Human-Serum versetzt, was einer Zellzahl von  $1 \times 10^3$  KBE/ml und einer Serumkonzentration von 25% (wie in Thrombozytenkonzentraten) entspricht. Die Ansätze wurden im Thermoblock bei 37°C und 400 Upm inkubiert. Anschließend wurden nach 1 h und 4 h 100 µl der Kulturen in Triplikaten mit einem Spiralplattierer auf LB-Medium ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte eine automatisierte Auszählung der Bakterienkolonien mit der Sphere Flash Apparatur.



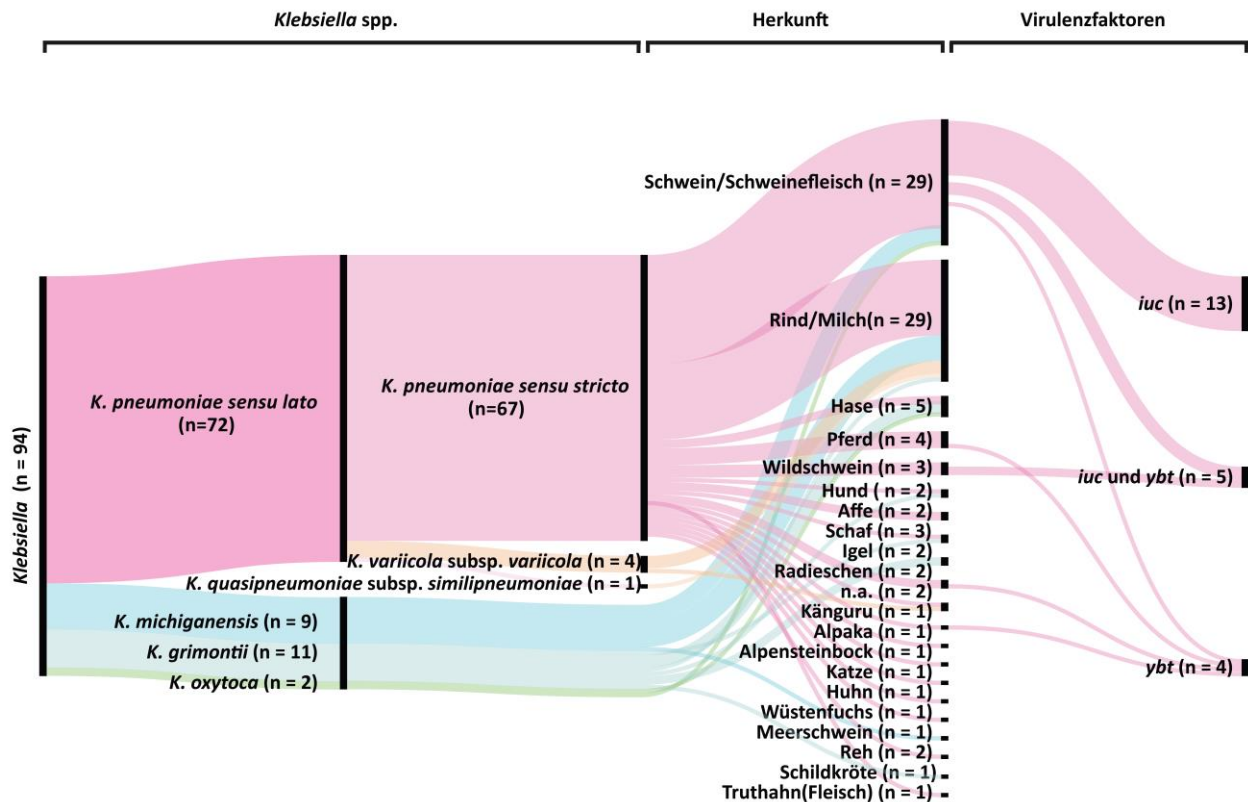
### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Genom-basierte Analysen von Tier- und Lebensmittel-assoziierten *Klebsiella* spp.-Isolaten aus Deutschland

In Zusammenarbeit mit dem CVUA Stuttgart wurden vom BfR 94 *Klebsiella* spp.-Isolate von verschiedenen Zoo-, Nutz- und Haustieren (n=88) sowie Lebensmitteln (n=4) zusammengetragen sowie zwei Isolate deren Herkunft nicht angegeben war. Der Großteil der Isolate (n=85) wurde im Zeitraum zwischen 2013 und 2017 gesammelt. Zur Abdeckung eines größeren Zeitraumes wurden zwei Isolate aus 2006 sowie ein Isolat aus 2004 in die Untersuchung einbezogen. Am BfR erfolgte eine MALDI-TOF-basierte Speziesidentifikation sowie eine antimikrobielle Empfindlichkeitstestung (Tabelle A 1). Unter den isolierten *Klebsiella* spp. war die Spezies *K. pneumoniae* (n=69, 73,4%) am häufigsten vertreten, gefolgt von *K. oxytoca* (n=21, 22,3%) und *K. variicola* (n=4, 4,3%). Wie erwartet, war der Großteil (n=73, 77,7%) der Isolate resistent gegen Ampicillin. Eine Übersicht zu den einzelnen Isolaten findet sich im Anhang (Tabelle A 1). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die *Klebsiella* spp.-Isolate basierend auf den vom BfR übermittelten Ganzgenomdaten genotypisiert.

##### 3.1.1. Identifizierung der *Klebsiella* spp.-Isolate

Anhand von *de novo* rekonstruierten Genom-Sequenzen wurde mit Hilfe des *Kleborate* Tools die *Klebsiella* Subspezies ermittelt. Wie in Abbildung 5 dargestellt, wurden 72 *K. pneumoniae sensu lato*-Isolate, elf *K. grimontii*-Isolate, neun *K. michiganensis*-Isolate und zwei *K. oxytoca*-Isolate identifiziert. Mit Hilfe der Ganzgenomdaten wurden die 72 *K. pneumoniae sensu lato*-Isolate über den KpSC hinaus weiter differenziert. Insgesamt wurden 67 *K. pneumoniae sensu stricto*-Isolate, vier *K. variicola*-Isolate und ein *K. quasipneumoniae*-Isolat nachgewiesen. Von den zuvor mittels der MALDI-TOF-Massenspektrometrie als *K. oxytoca* bestimmten Isolaten wurden anhand der Genomsequenzen zehn Isolate der Spezies *K. grimontii* und neun Isolate der Spezies *K. michiganensis* zugeordnet. Hier scheinen die hinterlegten MALDI-TOF Datenbanken noch nicht spezifisch genug zu sein, um zwischen den eng verwandten Phylogruppen diskriminieren zu können.



**Abbildung 5: Schematische Übersicht von 94 *Klebsiella* spp.-Isolaten aus Tieren und Lebensmittelprodukten aus Deutschland.** Dargestellt ist ein Sankey-Diagramm, das die Verteilung und relative Häufigkeit von *Klebsiella* spp.-Isolaten verschiedenen Ursprungs sowie die nachgewiesenen hypervirulenten Determinanten *iuc* (Aerobactin) und *ybt* (Yersiniabactin) zeigt.

### 3.1.2. Resistenz und Nachweis von Antibiotikaresistenzgenen

Von den 94 *Klebsiella*-Isolaten dieser Studie wiesen 73 (77.7%) eine Resistenz gegenüber Ampicillin auf (Tabelle A 1). Zusätzlich wurden vergleichsweise geringe Prävalenzen von Cefotaxim-Resistenz (5,3%), Ciprofloxacin-Resistenz (3,2%) und Colistin-Resistenz (1,1%) unter den Studien-Isolaten beobachtet.

Mittels des *Kleborate* Tools wurden die Ganzgenomdaten anschließend auf bekannte Resistenzgene untersucht. In Tabelle 15 wird ein Überblick über die Häufigkeit der identifizierten Resistenzgene gezeigt. Insgesamt trugen 80 der 94 Isolate Beta-Laktamase kodierende Gene (*bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>LAP</sub>, *bla*<sub>LEN</sub>, *bla*<sub>OKP-B</sub>, *bla*<sub>OXY</sub>, *bla*<sub>TEM</sub>) (Tabelle A 2). Darunter war das *bla*<sub>SHV-11</sub> Gen mit 28,4% am häufigsten vertreten. In 16 (17,0%) Isolaten wurden ESBL Gene identifiziert. Dabei wurde *bla*<sub>SHV-27</sub> (n=9; 9,6%) am häufigsten nachgewiesen. Außerdem wurden *bla*<sub>SHV-41</sub> (n=2; 2,1%), *bla*<sub>CTX-M-15</sub> (n=2; 2,1%) und *bla*<sub>CTX-M-14</sub> (n=2; 2,1%) sowie *bla*<sub>CTX-M-1</sub> (n=1; 1,1%) detektiert.

Tabelle 15: Übersicht über die Kapseltypen und Resistenzgene von 94 untersuchten *Klebsiella* spp.-Isolaten

K-Lous	Kapseltyp n*	Antibiotikaresistenzgene	
		Resistenzgen**	n*
KL3	3 (3.2%)	<b>Beta-Laktamase</b>	
KL6	3 (3.2%)	<i>bla</i> <sub>SHV-1</sub>	9 (9.6%)
KL9	1 (1.1%)	<i>bla</i> <sub>SHV-11</sub>	26 (27.4%)
KL10	3 (3.2 %)	<i>bla</i> <sub>SHV-33</sub>	1 (1.1%)
KL13	1 (1.1%)	<i>bla</i> <sub>SHV-37</sub>	2 (2.1%)
KL14	2 (2.1%)	<i>bla</i> <sub>SHV-61</sub>	1 (1.1%)
KL17	2 (2.1%)	<i>bla</i> <sub>SHV-108</sub>	2 (2.1%)
KL20	1 (1.1%)	<i>bla</i> <sub>SHV-119</sub>	1 (1.1%)
KL21	2 (2.1%)	<i>bla</i> <sub>SHV-157</sub>	1 (1.1%)
KL22	2 (2.1%)	<i>bla</i> <sub>SHV-168</sub>	1 (1.1%)
KL23	2 (2.1%)	<i>bla</i> <sub>SHV-187</sub>	1 (1.1%)
KL24	2 (2.1%)	<i>bla</i> <sub>SHV-194</sub>	1 (1.1%)
KL25	1 (1.1%)	<i>bla</i> <sub>SHV-215</sub>	1 (1.1%)
KL26	4 (4.3%)	<i>bla</i> <sub>SHV-234</sub>	1 (1.1%)
KL27	1 (1.1%)	<i>bla</i> <sub>SHV-244</sub>	1 (1.1%)
KL28	1 (1.1%)	<i>bla</i> <sub>LAP-2</sub>	2 (1.1%)
KL29	4 (4.2%)	<i>bla</i> <sub>LEN-16</sub>	1 (1.1%)
KL30	7 (7.4%)	<i>bla</i> <sub>LEN-19</sub>	1 (1.1%)
KL31	4 (4.3%)	<i>bla</i> <sub>LEN-24</sub>	1 (1.1%)
KL35	2 (2.1%)	<i>bla</i> <sub>LEN-32</sub>	1 (1.1%)
KL38	1 (1.1%)	<i>bla</i> <sub>OKP-B-6</sub>	1 (1.1%)
KL39	4 (4.3%)	<i>bla</i> <sub>OKP-B-6</sub>	2 (2.1%)
KL43	1 (1.1%)	<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub>	2 (2.1%)
KL46	2 (2.1%)	<i>bla</i> <sub>OXY1-1</sub>	3 (3.2%)
KL49	1 (1.1%)	<i>bla</i> <sub>OXY1-4</sub>	3 (3.2%)
KL50	1 (1.1%)	<i>bla</i> <sub>OXY1-5</sub>	2 (2.1%)
KL52	1 (1.1%)	<i>bla</i> <sub>OXY2-1</sub>	2 (2.1%)
KL54	1 (1.1%)	<i>bla</i> <sub>OXY5-1</sub>	1 (1.1%)
KL55	2 (2.1%)	<i>bla</i> <sub>OXY6-2</sub>	4 (4,3%)
KL58	1 (1.1%)	<i>bla</i> <sub>OXY6-3</sub>	1 (1.1%)
KL60	1 (1.1%)	<i>bla</i> <sub>OXY6-4</sub>	6 (6,4%)
KL61	3 (3.2%)	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	3 (3.2%)
KL67	1 (1.1%)		
KL68	2 (2.1%)	<b>ESBL</b>	
KL74	2 (2.1%)	<i>bla</i> <sub>SHV-27</sub>	9 (9.6%)
KL81	1 (1.1%)	<i>bla</i> <sub>SHV-41</sub>	2 (2.1%)
KL107	7 (7.4%)	<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>	1 (1.1%)
KL109	1 (1.1%)	<i>bla</i> <sub>CTX-M-14</sub>	2 (2.1%)
KL113	1 (1.1%)	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>	2 (2.1%)
KL114	1 (1.1%)		
KL116	1 (1.1%)	<b>Colistinresistenz</b>	
KL117	1 (1.1%)	<i>mrgB</i>	1 (1.1%)
KL122	2 (2.1%)		
KL128	1 (1.1%)		
KL132	1 (1.1%)		
KL141	1 (1.1%)		
KL142	2 (2.1%)		
KL161	2 (2.1%)		

\* Die angegebenen Prozentzahlen beziehen sich auf 94 *Klebsiella* spp. Isolate.

\*\*Einige Isolate tragen mehr als ein Beta-Laktamase-Gen.

Die *bla*<sub>SHV-27</sub> und *bla*<sub>SHV-41</sub>-tragenden Isolate zeigten allerdings nicht die für ESBL-Bildner typische Resistenz gegenüber Cefotaxim und/oder Ceftazidim. Um eine Ursache für diese Diskrepanz zu finden, wurden die Sequenzen der Resistenzgene genauer untersucht. Wie in Abbildung 6 dargestellt, konnte in allen 11 Isolaten eine Nukleotidsubstitution von Adenin zu Cytosin in der -10 Pribnow Box innerhalb der *bla*<sub>SHV-27/-41</sub> Promotorsequenzen detektiert werden. Laut Literatur resultiert dieser Austausch in einer abgeschwächten Genexpression und bedingt den non-ESBL-Phänotyp [153].



**Abbildung 6: Vergleich der *bla*<sub>SHV</sub> Promotorsequenzen.** Dargestellt ist ein Sequenzvergleich der Promotorsequenzen der ESBL-Gene *bla*<sub>SHV-27</sub> und *bla*<sub>SHV-41</sub> mit der Wildtyp-Promotorsequenz (AF293345). Eine Aminosäuresubstitution von A zu C (violett) in der -10 Pribnow Box bedingt einen non-ESBL-Phänotyp (Empfindlichkeit gegenüber Drittgenerations-Cephalosporinen) dieser *K. pneumoniae*-Isolate.

In den Genom-Analysen konnte ebenfalls für das Colistin-resistente Isolat 11265 eine Mutation des intrinsischen *mgrB*-Gens durch eine *ISKpn14*-Insertion detektiert werden, welche in einem vorzeitigen Stoppcodon und einem trunkeierten und nicht funktionellen Protein resultiert.

Aminosäuresubstitutionen in GyrA (S83I) und ParC (S80I) (n=2) sowie die erworbenen Resistenzgene *qnrB* (n=1) und *qnrS* (n=1) vermitteln eine Resistenz gegen Ciprofloxacin in drei Isolaten.

Eine Resistenz gegen das Carbapenem Meropenem wurde bei den Studienisolaten nicht beobachtet.

### 3.1.3. Kapsel-Typisierung

In Tabelle 15 wird ein Überblick über die identifizierten Kapseltypen gegeben. Es wurden in der Gesamtstammsammlung der 94 *Klebsiella* spp.-Isolate 48 verschiedene Kapseltypen festgestellt, wobei 38 Kapseltypen auf den *K. pneumoniae* Spezies Komplex entfielen (Abbildung 7). Die am häufigsten vertretenen Kapseltypen waren KL30 (n=7, 7,4%) und KL107 (n=7, 7,4%). Insgesamt

zeigt das Ergebnis eine hohe Diversität unter *Klebsiella* spp.-Isolaten aus Tieren und Lebensmitteln. Der Großteil der identifizierten Kapseltypen wurde bereits bei humanen *Klebsiella*-Isolaten aus Infektionen beschrieben. Weiterhin konnte in dieser Stammsammlung kein Kapseltyp, der mit Hypervirulenz assoziiert wird, nachgewiesen werden.

#### 3.1.4. Nachweis von Virulenzgenen und Virulenzplasmiden

Alle 72 KpSC-Isolate wurden auf das Vorhandensein der Virulenzfaktoren Aerobactin (*iuc*), Colibactin (*clb*), Salmochelin (*iro*), Yersiniabactin (*ybt*) und der Kapselsynthese-Regulatoren (*rmpA/A2*) hin untersucht. Nur in der Spezies *K. pneumoniae* konnten Virulenzfaktoren detektiert werden. Aerobactin wurde in 18 (19,1%) *K. pneumoniae*-Isolaten aus Schweinen (n=16), und Wildschweinen (n=2) identifiziert. Yersiniabactin wurde in neun (9,6%) *K. pneumoniae*-Isolaten von Schweinen (n=4), Wildschweinen (n=2), einem Pferd (n=1), einem Känguru (n=1) und Radieschen (n=1) nachgewiesen (Abbildung 5). Darunter waren fünf Isolate aus Schweinen (n=3) und Wildschweinen (n=2), die sowohl Aerobactin als auch Yersiniabactin als Virulenzfaktoren besaßen. Colibactin, Salmochelin und die Kapselsynthese-Regulatoren (*rmpA/rmpA2*) wurden in keinem der untersuchten Isolate nachgewiesen.

Die Sequenzanalyse der Aerobactin positiven Isolate zeigte, dass alle Isolate die Allel-Variante *iuc\_3* besaßen. Für das Isolat 30312\_2 konnte mittels eines Hybrid-Assemblys aus MinION- und Miseq-Sequenzdaten ein etwa 190 kbp großes IncFIB<sub>K</sub> Plasmid rekonstruiert werden, welches neben Aerobactin auch ein Fimbrienprotein sowie einen Eisentransporter kodiert. Das rekonstruierte Plasmid wurde als Mappingreferenz für alle *iuc\_3* positiven Isolate eingesetzt. Anhand dieser Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass alle *iuc\_3* positiven Isolate ein Plasmid desselben Replikontyps, eine *tra-trb* Konjugationsapparatur besitzen und die Verteilung der Plasmide in Bezug auf *K. pneumoniae*-Linien divers ist (Tabelle A 2).

#### 3.1.5. Phylogenie von *K. pneumoniae* Spezies Komplex Isolaten

Für die phylogenetische Analyse der 72 KpSC Isolate wurden die assemblierten Genome mittels der Ridom Software *SeqSphere* ausgewertet. Um einen ersten Einblick in die Population der KpSC zu erhalten, wurden zunächst die Sequenztypen basierend auf dem KpSC MLST Schema bestimmt.

**Tabelle 16: Übersicht der identifizierten Sequenztypen von 72 untersuchten KpSC-Isoleten**

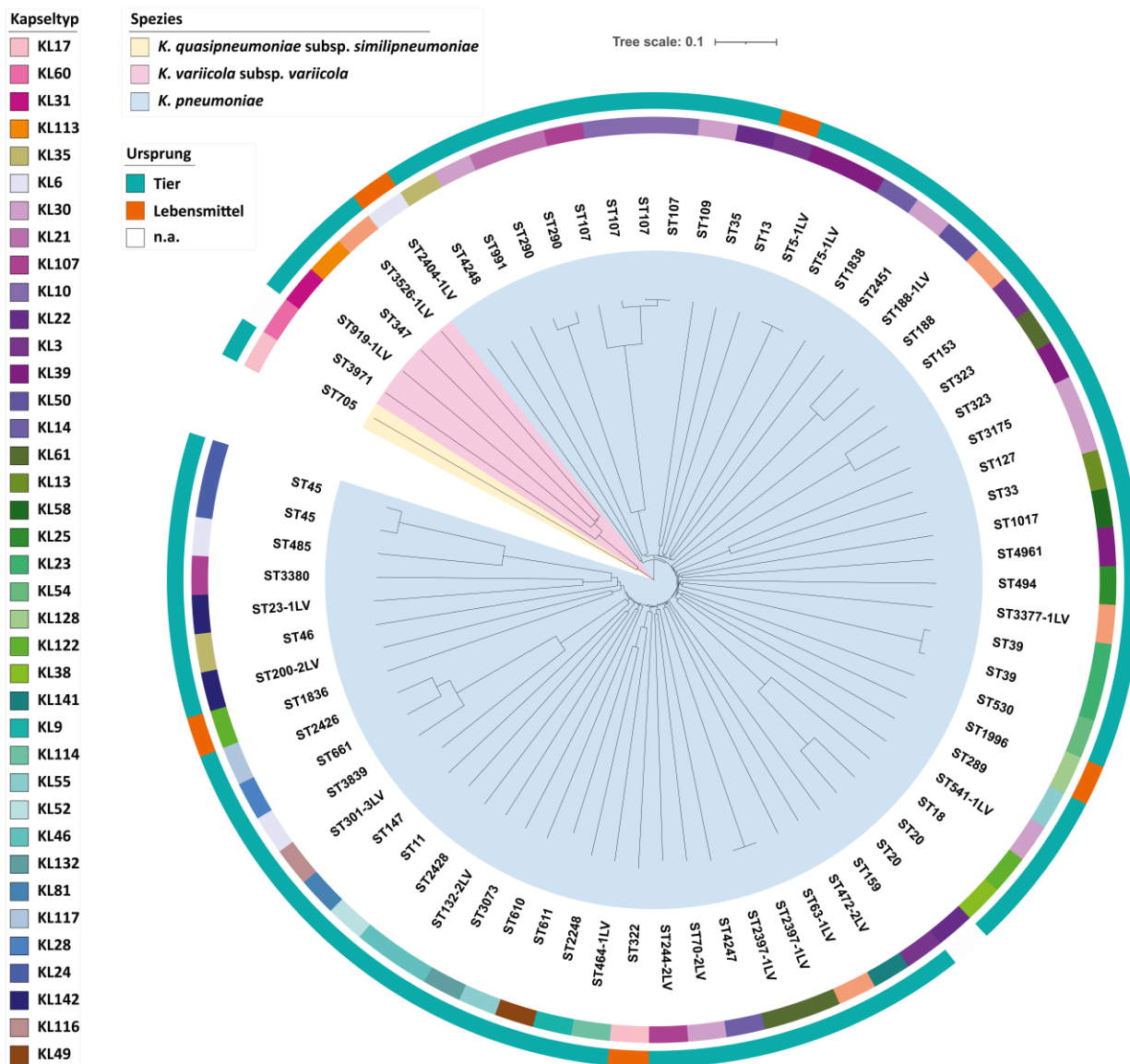
Bekannte Sequenztypen		Neue Sequenztypen	
Sequenztyp	n*	Sequenztyp**	n*
ST11	1 (1.4%)	ST5-1LV	2 (2.8%)
ST13	1 (1.4%)	ST23-1LV	1 (1.4%)
ST18	1 (1.4%)	ST63-1LV	1 (1.4%)
ST20	2 (2.7%)	ST70-2LV	1 (1.4%)
ST33	1 (1.4%)	ST132-2LV	1 (1.4%)
ST35	1 (1.4%)	ST188-1LV	1 (1.4%)
ST39	2 (2.8%)	ST200-2LV	1 (1.4%)
ST45	2 (2.8%)	ST244-2LV	1 (1.4%)
ST46	1 (1.4%)	ST301-3LV	1 (1.4%)
ST107	4 (5.8%)	ST464-1LV	1 (1.4%)
ST109	1 (1.4%)	ST472-2LV	1 (1.4%)
ST127	1 (1.4%)	ST541-1LV	1 (1.4%)
ST147	1 (1.4%)	ST919-1LV	1 (1.4%)
ST153	1 (1.4%)	ST2397-1LV	2 (2.8%)
ST159	1 (1.4%)	ST2404-1LV	1 (1.4%)
ST188	1 (1.4%)	ST3377-1LV	1 (1.4%)
ST289	1 (1.4%)	ST3381-1LV	1 (1.4%)
ST290	2 (2.7%)	ST3526-1LV	1 (1.4%)
ST322	1 (1.4%)		
ST323	2 (2.8%)		
ST347	1 (1.4%)		
ST485	1 (1.4%)		
ST494	1 (1.4%)		
ST530	1 (1.4%)		
ST610	1 (1.4%)		
ST611	1 (1.4%)		
ST661	1 (1.4%)		
ST705	1 (1.4%)		
ST991	1 (1.4%)		
ST1017	1 (1.4%)		
ST1836	1 (1.4%)		
ST1838	1 (1.4%)		
ST1996	1 (1.4%)		
ST2248	1 (1.4%)		
ST2426	1 (1.4%)		
ST2428	1 (1.4%)		
ST2451	1 (1.4%)		
ST3073	1 (1.4%)		
ST3175	1 (1.4%)		
ST3380	1 (1.4%)		
ST3839	1 (1.4%)		
ST3971	1 (1.4%)		
ST4247	1 (1.4%)		
ST4248	1 (1.4%)		

\* Die angegebenen Prozentzahlen beziehen sich auf die 72 KpSC-Isolate.

\*\* -LV Anzahl der Allelabweichungen zu bekannten Sequenztypen

Insgesamt wurden 62 Sequenztypen, darunter 18 neue, identifiziert (Tabelle 16). Der am häufigsten vertretene Sequenztyp war ST107 (n = 4; 5,6%), gefolgt von ST20 (n=2; 2,8%), ST39 (n=2; 2,8%), ST45 (n=2; 2,8%), ST290 (n=2; 2,8%) und ST323 (n=2; 2,8%). Außerdem wurden zwei

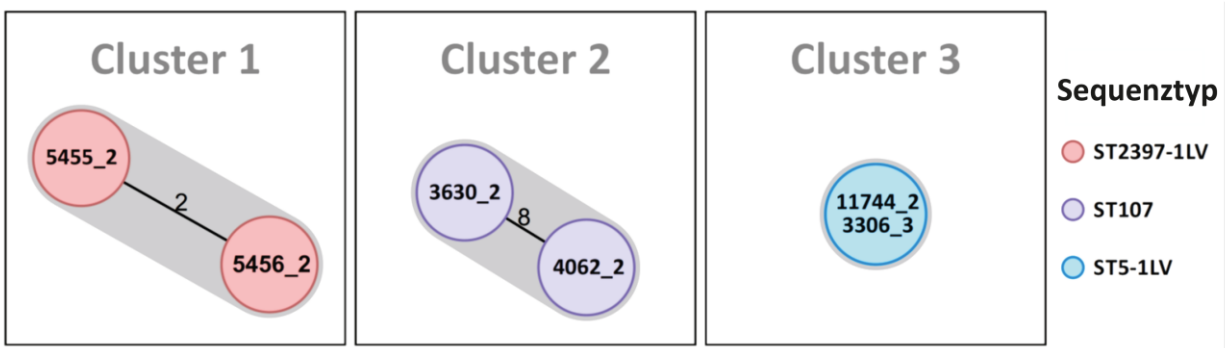
Sequenztypen in Lebensmittelprodukten nachgewiesen, die häufig mit nosokomialen *K. pneumoniae*-Infektionen assoziiert werden: ST11 (Schwein; n=1) und ST147 (Rind n=1) (Anhang, Tabelle A 2).



**Abbildung 7: Phylogenetischer Baum von 72 KpSC (*K. pneumoniae* Spezies Komplex)-Isolaten aus Tieren und Lebensmitteln.** Der *Neighbor-Joining*-Tree wurde basierend auf dem KpSC-cgMLST Schema mit der Ridom Software *SeqSphere* berechnet und mittels der Software *iToI* visualisiert. Mit dem inneren Farbkreis werden die KpSC-Phylogruppen markiert (siehe Legende) und den einzelnen Isolaten wurden die 62 ermittelten Sequenztypen zugewiesen. Die beiden äußeren Farbkreise repräsentieren die 38 Kapsel-Loci und die Herkunft der Isolate (siehe Legende). n.a.; keine Angaben (*not assigned*).

Um Aussagen über direkte Verwandtschaftsverhältnisse der KpSC-Isolate treffen zu können, wurden die Ganzgenom-Daten mittels des KpSC cgMLST Schemas typisiert. Im Gegensatz zum MLST-

Schema, welches nur sieben Haushaltsgene nutzt, werden bei der cgMLST Typisierung weitaus mehr Gene des Kerngenoms berücksichtigt. Anhand des auf 2358 Zielgenen basierenden cgMLST Schemas wurden klonale Gruppen bestimmt und mittels des *neighbor-joining*-Algorithmus ein phylogenetischer Baum (Abbildung 7) erstellt. Im Wesentlichen zeigen die Verwandtschaftsanalysen eine geringe genetische Verwandtschaft. Die vier ST107-Isolate aus Kuhmilch (n=1) und Schweinen (n=3) unterteilen sich in zwei Subkladen. Dabei zeigten die zwei Schweine-Isolate 3630\_2 und 4062\_2 eine hohe genetische Verwandtschaft (acht Allelunterschiede). Es wurden zwei weitere Cluster genetisch eng verwandter Isolate detektiert. Für die zwei Schweine-Isolate 5455\_2 und 5456\_2 des Sequenztyps ST2397-1LV wurden zwei Allelunterschiede detektiert. Die Schweine-Isolate 11744\_2 und 3306\_3 weisen keine Allelunterschiede auf.



**Abbildung 8: Genetisch verwandte Cluster von *K. pneumoniae*-Isolaten basierend auf cgMLST.** Genetische Distanzen wurden basierend auf den Allelprofilen von 2385 Zielgenen berechnet. Die Anzahl der unterschiedlichen Allele zwischen den Isolaten wird angezeigt.



## 3.2. Population von hvKp-Isolaten in Deutschland

### 3.2.1. Auswahl von hvKp-Isolaten

In Zusammenarbeit mit Diagnostiklaboren und dem Nationalen Referenzzentrum für Gram-negative Krankenhauserreger in Bochum wurden insgesamt 22 hypervirulente *K. pneumoniae*-Isolate aus den Jahren 2009 sowie 2014 bis 2019 identifiziert. Die Isolate wurden aufgrund eines positiven String Tests und/oder dem Vorhandensein der Virulenzgene *rmpA*, *rmpA2* und/oder des Kapseltyps K1 (*magA*) selektiert. Hierfür wurde eine Multiplex PCR etabliert (2.11.8.1). Drei der 22 Isolate stammten aus dem Respirationstrakt, je zwei Isolate aus Blutkulturen und Leberabszessen, je ein Isolat von einem Leisten-, Peritoneal- und Wundabstrich sowie einer Rindermastitis. Zu zwölf Isolaten wurden keine näheren Angaben bezüglich des Ursprungs übermittelt. Anhand von Ganzgenom-Daten der Isolate wurden die Sequenz- und die Kapseltypen sowie die vorhandenen Resistenz- und weitere Virulenzgene charakterisiert. Weiterhin wurden die vorliegenden Ganzgenomdaten mittels des KpSC cgMLST Schemas typisiert und die phylogenetische Verwandtschaft der Isolate untersucht.

### 3.2.2. Antibiotikaresistenzen und Nachweis von Antibiotikaresistenzgenen in 22 hvKp-Isolaten

In Tabelle 17 ist einen Überblick über die im Rahmen dieser Arbeit sequenzierten 22 hvKp-Isolate und die jeweiligen Resistenzgene gezeigt. Insgesamt trugen 18 (81,8%) Isolate Beta-Laktamase kodierende Gene. Darunter wurden die Resistenzgene *bla*<sub>SHV-11</sub> (n=9; 40,9%) und *bla*<sub>OXA-1</sub> (n=10; 45,5%) am häufigsten nachgewiesen, gefolgt von *bla*<sub>SHV-1</sub> (n=7; 31,8%) und *bla*<sub>TEM-1</sub> (n=6; 27,3%) sowie *bla*<sub>OXA-2</sub> (n=1; 4,5%) und *bla*<sub>OXA-9</sub> (n=1; 4,5%). In 15 (68,2%) Isolaten wurden ESBL Gene identifiziert; *bla*<sub>CTX-M-15</sub> (n=9; 40,9%) war am häufigsten nachweisbar. Außerdem wurden *bla*<sub>CTX-M-55</sub> (n=4; 18,2%), *bla*<sub>CTX-M-14</sub> (n=1; 4,5%), *bla*<sub>CTX-M-27</sub> (n=1; 4,5%) und *bla*<sub>SHV-116</sub> (n=1; 4,5%) detektiert. Darüber hinaus trugen 14 (63,6%) Isolate Carbapenemase-Gene. Acht Isolate (36,4%) besaßen *bla*<sub>OXA-48</sub>, fünf Isolate (27,7%) *bla*<sub>NDM-1</sub> und je ein Isolat *bla*<sub>OXA-244</sub> und *bla*<sub>VIM-1</sub>. Ein Isolat zeigte den Besitz von zwei Carbapenemase-Genen vom Typ *bla*<sub>NDM-1</sub> und *bla*<sub>OXA-48</sub>.

**Tabelle 17: Übersicht über die im Rahmen der vorliegenden Arbeit sequenzierten 22 hvKp-Isolaten aus Deutschland mit den jeweiligen Beta-Laktamase kodierenden Genen**

RKI ID	Material/Infektion	Beta-Laktamasen			ESBL <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	Carbapenemasen
		<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	<i>bla</i> <sub>OXA</sub>		
09-0219	n.a.	11	-	-	-	<i>bla</i> <sub>VIM-1</sub>
14-0574	Wundabstrich	1	-	1	55	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>
15-0312	Peritonealabstrich	11	1	1	15	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>
15-0316	Trachealsekret	11	1	1	15	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>
15-0318	bronchoalveoläre Lavage	11	1	1	15	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>
17-0609	Leberabzess	-	-	-	-	-
17-0736	Blutkultur	11	-	-	-	-
18-0005	Rachenabstrich	-	-	-	-	-
18-0030	Mastitis (Rind)	116	-	-	-	-
18-0169	n.a.	28	1	1	15	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>
18-0256	n.a.	1	-	1;2	55	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>
18-0260	n.a.	11	-	9	15	<i>bla</i> <sub>NDM-1</sub>
18-0263	n.a.	1	-	1	55	<i>bla</i> <sub>OXA-244</sub>
18-0408	n.a.	11	-	-	15	<i>bla</i> <sub>NDM-1</sub>
18-0414	n.a.	11	1	1	15	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>
18-0430	n.a.	11	-	-	15	<i>bla</i> <sub>NDM-1</sub>
18-0431	n.a.	-	-	-	-	<i>bla</i> <sub>NDM-1</sub>
18-0439	n.a.	11	1	1	15	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>
18-0600	n.a.	207	-	-	27	-
18-0637	Wundabstrich	1	-	-	14	-
19-0036	Blutkultur	1	-	-	-	-
19-0213	Leberabzess	1	-	1	55	<i>bla</i> <sub>NDM-1</sub> ; <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>

n.a. nicht angegeben

### 3.2.3. MLST- und Kapsel-Typisierung von hvKp-Isolaten aus Deutschland

In Tabelle 18 ist eine Übersicht über die Identifizierten MLST- und Kapseltypen gezeigt.

**Tabelle 18: Übersicht über die Sequenz- und Kapseltypen von 22 hvKp-Isolaten**

Sequenztyp n=13	Kapseltyp n=9	Absolute und relative Häufigkeit*
ST5	K39	n=1 (4,5%)
ST17	K25	n=1 (4,5%)
ST23	K1	n=5 (22,7 %)
	K57	n=4 (18,2%)
ST66	K2	n=1 (4,5%)
ST147	K64	n=2 (9,1%)
ST307	K102	n=1 (4,5%)
ST310	K1	n=1 (4,5%)
ST380	K2	n=1 (4,5%)
ST392	K27	n=1 (4,5%)
ST395	K2	n=1 (4,5%)
ST412	K57	n=1 (4,5%)
ST893	K20	n=1 (4,5%)
ST2398	K25	n=1 (4,5%)

\* Die angegebenen Prozentzahlen beziehen sich auf 22 hvKp-Isolate

Die Ergebnisse zeigen eine hohe Diversität der Sequenztypen unter den gesammelten hvKp aus Deutschland. Insgesamt wurden 13 verschiedene Sequenztypen ermittelt. Der am häufigsten vertretende Sequenztyp war ST23 (n=9; 40,9%), gefolgt von ST147 (n=2; 9,1%). Jeweils ein Isolat konnte dem Sequenztyp ST5, ST17, ST66, ST307, ST310, ST380, ST392, ST395, ST412, ST893 oder ST2395 zugeordnet werden.

### 3.2.4. Nachweis von Virulenzgenen in 22 hvKp

Mittels der Analyse-Software *Kleborate* [154] wurden die Genom-Sequenzen der 22 hvKp-Isolate auf das Vorhandensein der Virulenzfaktoren *clb*, *iuc*, *iro*, *rmpA*, *rmpA2* und *ybt* untersucht (Tabelle 19). Die Gene für das Siderophor *iuc* wurde mit 90,9% (n=20) am häufigsten identifiziert, gefolgt vom Siderophor-Gen *ybt* mit 86,4% (n=19).

Tabelle 19: Übersicht über die 22 hvKp-Isolate aus Deutschland mit den jeweiligen Virulenzfaktoren.

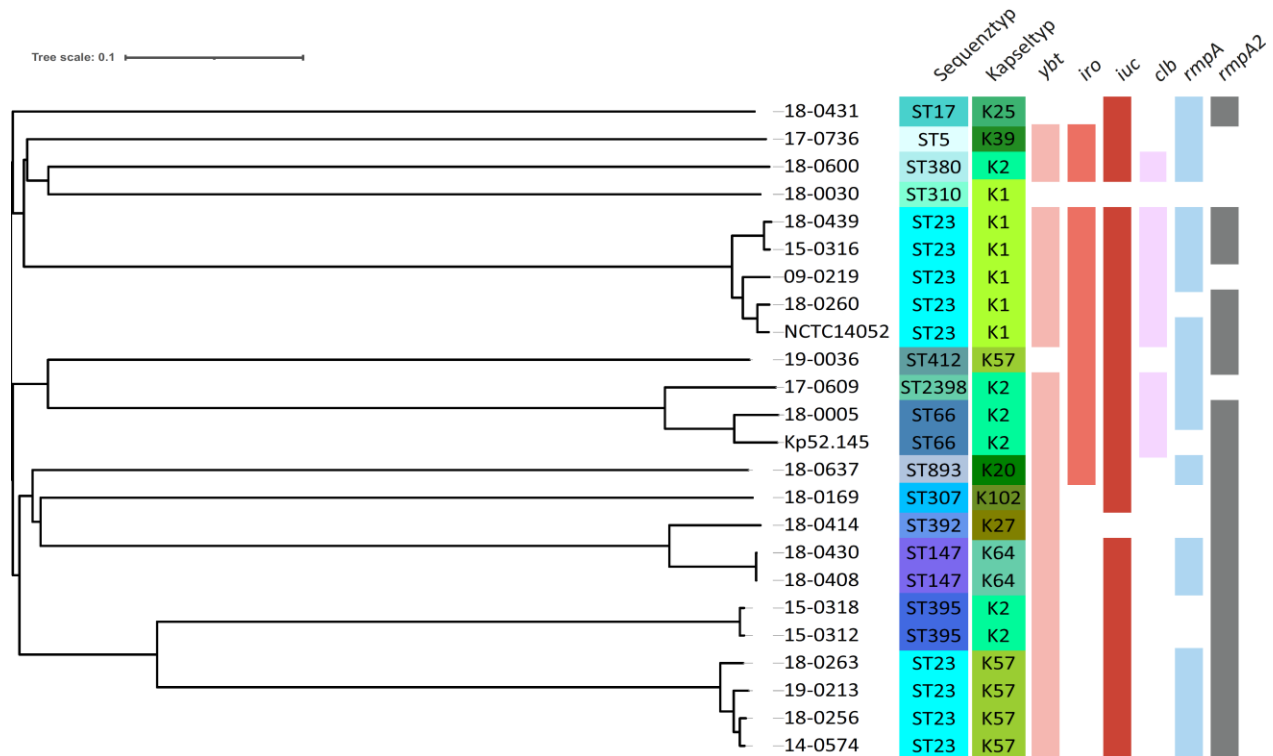
RKI ID	ST	K-Typ	Virulenzfaktoren					
			<i>ybt</i>	<i>iro</i>	<i>iuc</i>	<i>clb</i>	<i>rmpA</i>	<i>rmpA2</i>
09-0219	23	K1	+	+	+	+	+	-
14-0574	23	K57	+	-	+	-	+	+
15-0312	395	K2	+	-	+	-	-	+
15-0316	23	K1	+	+	+	+	+	+
15-0318	395	K2	+	-	+	-	-	+
17-0609	2398	K2	+	+	+	+	+	-
17-0736	5	K39	+	+	+	-	+	-
18-0005	66	K2	+	+	+	+	+	+
18-0030	ST310	K1	-	-	-	-	-	-
18-0169	307	K102	+	-	+	-	-	+
18-0256	23	K57	+	-	+	-	+	+
18-0260	23	K1	+	+	+	+	-	+
18-0263	23	K58	+	-	+	-	+	+
18-0408	147	K64	+	-	+	-	+	+
18-0414	392	K27	+	-	-	-	-	+
18-0430	147	K64	+	-	+	-	+	+
18-0431	17	K25	-	-	+	-	+	+
18-0439	23	K1	+	+	+	+	+	+
18-0600	380	K2	+	+	+	+	+	-
18-0637	893	K20	+	+	+	-	+	+
19-0036	412	K57	-	+	+	-	+	+
19-0213	23	K57	+	-	+	-	+	+

Die Gene *rmpA* und *rmpA2* wurden in 16 (72,7%) bzw. 17 (77,3%) Isolaten und *iro* in zehn (45,5%) Isolaten nachgewiesen. Das Colibactin kodierende Gen *clb* wurde nur bei etwa einem Drittel der Isolate gefunden (n=7; 31,8%). In zwei ST23-Isolaten wurden alle genannten Virulenzfaktorgene

sowie der Kapseltyp K1 nachgewiesen; und in dem Isolat 18-0030 des Kapseltyps K1 aus einer Rindermastitis wurden keine weiteren Virulenzfaktorgene detektiert.

### 3.2.5. Populationsstruktur von hvKp-Isolaten in Deutschland

Um Aussagen über die Verwandtschaftsverhältnisse der hvKp-Isolate treffen zu können, wurden die Isolate basierend auf dem in der Ridom Software [155] *SeqSphere* implementierten KpSC-cgMSLT-Schema typisiert und mittels des *neighbor-joining* Algorithmus ein phylogenetischer Baum berechnet (Abbildung 9).



**Abbildung 9: Phylogenetischer Baum von hvKp-Isolaten aus Deutschland und den.** Dargestellt ist die Phylogenie der 22 hvKp-Isolate unter Einbezug der hvKp-Referenzisolate NCTC14052 und Kp52.145. Es sind die Sequenz- und Kapseltypen sowie das Vorhandensein der Virulenzfaktor-kodierenden Gene für Yersiniabactin (*ybt*), Salmochelin (*iro*), Aerobactin (*iuc*), Colibactin (*clb*), Kapselsynthese-Regulatoren (*rmpA/rmpA2*) angegeben. Der *Neighbor-Joining*-Tree wurde basierend auf dem KpSC-cgMSLT-Schema mit der Ridom Software *SeqSphere* berechnet und mittels *iTol* visualisiert.

Die phylogenetischen Analysen zeigen, dass die hvKp-Isolate aus einer Reihe von Unterlinien bestehen, die sich tief verzweigen. Insgesamt wurden drei Cluster beobachtet, in denen die Isolate eine geringe Alleldiversität aufwiesen. Die geringste Diversität mit einem einzigen Allelunterschied wurden für die ST147-Isolate 18-0408 und 18-0430 beobachtet. Die ST395-Isolate 15-0312 und 15-0318 hatten elf Allelunterschiede und die ST23-Isolate 14-0574 und 18-0256 zeigten 14

Allelunterschiede. Des Weiteren wurden die Verwandtschaftsverhältnisse der Isolate des dominanten Sequenztyp ST23 stärker aufgelöst. Die ST23-Isolate bilden zwei getrennte Kladen in denen zum einen die fünf ST23-K1-Isolate und zum anderen die vier ST57-Isolate enger zusammengruppieren (Abbildung 9). Von allen untersuchten hvKp-Isolaten zeigen die ST23-K1-Isolate 18-0260, 09-219, 15-0316 und 18-0439 die geringsten Allelunterschiede (17-94) zu dem Referenzstamm NCTC14052. Die K2 Isolate 17-0609 und 18-0005 gruppieren mit dem Referenzstamm *K. pneumoniae* Kp52.145 (ST66-K2), wobei das Isolat 18-0005 ebenfalls zum Sequenztyp ST66 gehört und die geringsten Allelunterschiede (114) zum Referenzstamm zeigt. Bisher wurden nur selten hypervirulente ST66-K2 Stämme gefunden, weshalb das Verwandtschaftsverhältnis des Isolats 18-0005 zu den bisher bekannten ST66-K2-Isolaten genauer untersucht wurde (3.3).

### 3.3. Hypervirulente *K. pneumoniae* Linie ST66-K2

Im Dezember 2017 wurde ein männlicher Patient aufgrund einer schmerzhaften Rachenentzündung in der infektiologischen Ambulanz des Uniklinikums Leipzig vorstellig. In einer Untersuchung wurden bei dem Patienten eine Pharyngitis und eine Läsion an der Uvula festgestellt. Die Anamnese ergab, dass sich der Patient in einer homosexuellen Partnerschaft mit einem HIV infizierten, Syphilis- und Chlamydien-positiven Partner befand. Er gab an, zuvor ungeschützten oralen Geschlechtsverkehr mit einer dritten Person gehabt zu haben. Die Untersuchungen auf Erreger von Geschlechtskrankheiten fielen negativ aus. Im Rachenabstrich wurde allerdings das Bakterium *K. pneumoniae* nachgewiesen. Der Patient konnte erfolgreich mit einer lokal-oralen Therapie mittels einer Octenidin-Mundspülung therapiert werden



Abbildung 10: Hypermukovisköser Phänotyp des *K. pneumoniae*-Isolates 18-0005.

Tabelle 20: Antibiotogramm des *K. pneumoniae*-Isolates 18-0005

Antibiotikum	MHK (mg/L)	Interpretation
Piperacillin	≤ 4	S
Piperacillin/Tazobactam	≤ 4	S
Cefotaxim	≤ 1	S
Ceftazidim	≤ 1	S
Cefepim	≤ 1	S
Aztreonam	≤ 1	S
Imipenem	≤ 0.25	S
Meropenem	≤ 0.25	S
Amikacin	≤ 2	S
Gentamicin	≤ 1	S
Tobramycin	≤ 1	S
Ciprofloxacin	≤ 0.25	S
Moxifloxacin	≤ 0.25	S
Tigecycline	≤ 0.5	S
Fosfomycin	≤ 16	S
Colistin	≤ 0.5	S
Trimethoprim/Sulfamethaxazol	≤ 2	S

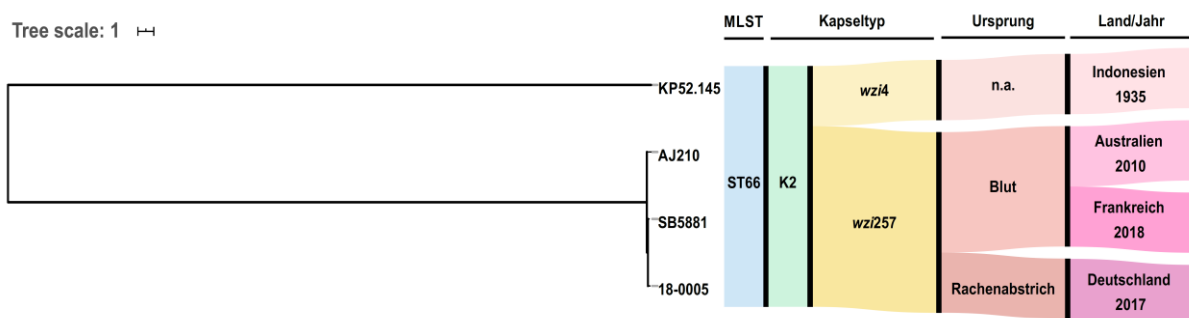
MHK, minimale Hemmstoffkonzentration; S, sensibel

### 3.3.1. Genotypisierung

Die assemblierten MiSeq-Genomdaten wurden mittels *Kleborate* ausgewertet. Das *K. pneumoniae*-Isolat 18-0005 wurde dem Sequenztyp ST66 und dem Kapseltyp K2 zugeordnet. Darüber hinaus wurden die für hypervirulente *K. pneumoniae* der klonalen Linie ST66-K2 beschriebenen Virulenzfaktoren RmpA/RmpA2, Aerobactin und Salmochelin detektiert. Obwohl das Isolat Kp52.145 als Referenzstamm für hypervirulente *K. pneumoniae* des Kapseltyps K2 geführt wird, wurden zuvor nur zwei Infektionen durch ST66-K2-Isolate aus Australien (2014) und aus Frankreich (2020) beschrieben. Mit dem Isolat 18-0005 wurde zum ersten Mal eine *K. pneumoniae* der klonalen Linie ST66-K2 in Deutschland isoliert.

### 3.3.2. Phylogenie

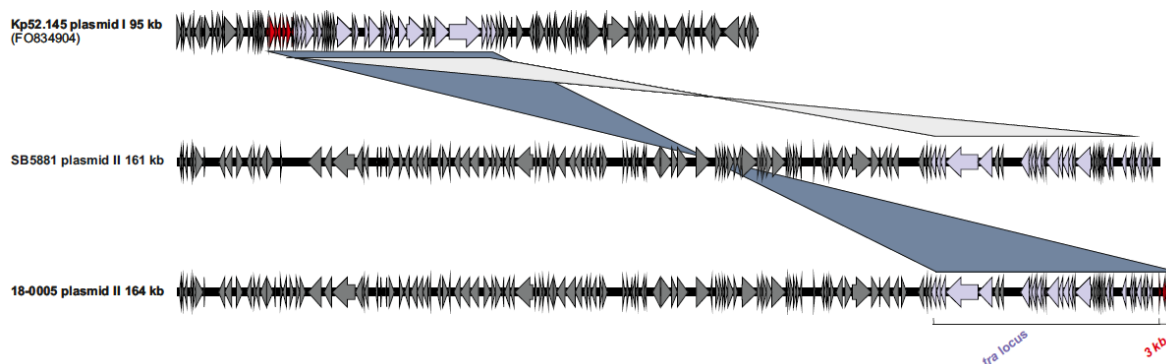
Um die Verwandtschaft des Isolats 18-0005 zu den Isolaten Kp52.145, AJ210 und SB5881 zu untersuchen wurde ein SNP-basierter *Maximum-Likelihood* Baum (Abbildung 11) generiert. Als Referenzgenom wurde die Sequenz von Kp52.142 (GenBank FO834906) verwendet. Die phylogenetischen Untersuchungen zeigten, dass das Isolat 18-0005 enger mit dem Isolat SB5881 aus Frankreich (84 SNPs) verwandt ist, als mit dem Isolat AJ210 aus Australien (152 SNPs) und dem Referenzisolat Kp52.145 (409 SNPs) aus Indonesien.



**Abbildung 11: Phylogenetische Analyse von ST66-K2 *K. pneumoniae*-Isolaten.** Dargestellt ist die Phylogenie der vier hvKp-Stämme Kp.52.145, AJ210, SB5881 und 18-0005. Der *Maximum-Likelihood*-Baum wurde mit *PhyML* auf der Grundlage von single nucleotide polymorphisms (SNPs) berechnet, die nach dem Mapping auf die Kp52.145-Sequenz gefiltert wurden. n.a.: nicht angegeben

### 3.3.3. Plasmidrekonstruktion und Sequenzvergleich

Für *K. pneumoniae*-Isolate der klonalen Linie ST66-K2 ist das Vorhandensein von zwei 95 kb und 121 kb großen Plasmiden beschrieben. Um die Plasmid-Sequenzen des *K. pneumoniae*-Isolates 18-0005 zu rekonstruieren, wurde das Genom mittels MinION-Technologie sequenziert. Aus den MinION- und Illumina-Sequenzdaten wurde ein hybrid-Assembly mittels *Unicycler* generiert. Anhand des assemblierten Genoms wurden drei Plasmide rekonstruiert [156]. Die rekonstruierten Plasmide hatten eine Größe von 95 kb (18-0005 Plasmid I), 143 kb (18-0005 Plasmid II) und 3,7 kb (18-0005 Plasmid III). In einer *blastn* Analyse wurden die rekonstruierten Plasmide gegen die NCBI-Datenbank auf Sequenzübereinstimmungen mit bekannten Plasmiden verglichen. Das Ergebnis zeigte, dass die Sequenz von dem 18-0005 Plasmid I identisch mit dem Plasmid I aus den drei bisher bekannten ST66-K2 Isolaten Kp52.145 [157, 158], AJ201 [7] und SB5881 [157] ist. Das 3,7 kb große 18-0005 Plasmid III war identisch mit dem Plasmid III aus SB5881. Rodrigues *et al.* beschrieben für das SB5881 Plasmid III eine 40 kb große Region, die identisch mit dem Konjugationsmaschinerie-Gencluster von Plasmid I war [157]. Die gleiche Region wurde auch in dem 18-0005 Plasmid II identifiziert. Wie in Abbildung 12 gezeigt, beherbergte das 18-0005 Plasmid II jedoch eine weitere 3 kb große Region des Plasmids I. Dieses Fragment enthielt Gene für putative Transkriptionsregulatoren und mehrere uncharakterisierte Proteine.



**Abbildung 12: Vergleich der Plasmidsequenzen der hvKp-Stämme Kp52.145, SB5881 und 18-0005.** Dargestellt ist ein Sequenzalignment der Plasmide Kp52.145 Plasmid I, SB5881 Plasmid II und 18-0005 Plasmid II. Basierend auf einer paarweisen BLAST-Analyse (*blastn*) der Sequenzen und visualisiert durch das Programm *Easyfig* (v.2.2.2). Die ORFs sind als Pfeile dargestellt. Der gemeinsame *tra*-Locus (hellviolett) und das neue integrierte 3 kb-Fragment (rot) sind farblich gekennzeichnet.

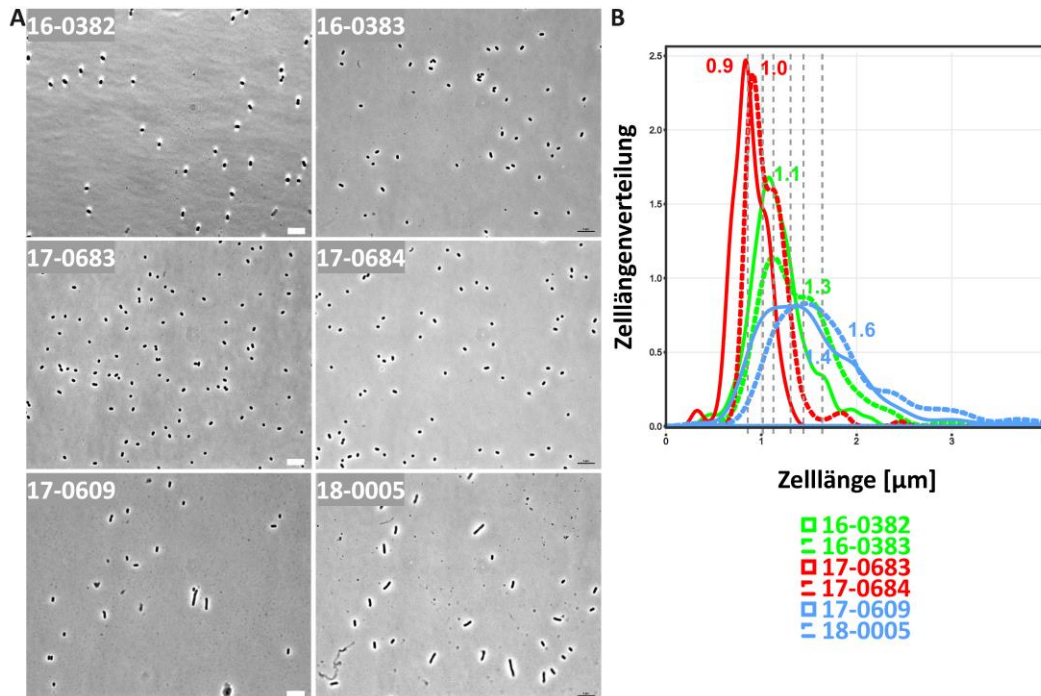


### **3.4. Funktionelle Analysen von *K. pneumoniae* zur Erfassung einer möglichen Wirtsassoziation, Wirtsadaption und Auswirkungen auf die Virulenz sowie Antibiotikaresistenz**

Die RKI-Arbeitsgruppe Multiresistente Gram-negative Erreger verfügt über eine Sammlung von mehreren hundert *K. pneumoniae*-Isolaten. Alle an das RKI eingesendeten *K. pneumoniae*-Isolate werden phänotypisch hinsichtlich der Speziesidentifikation und ihrer Antibiotikaempfindlichkeit charakterisiert. Außerdem werden die vorhandenen Beta-Laktamase-Gene amplifiziert und sequenziert. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde für die funktionellen Analysen ein Stammset aus zwei „classic“ *K. pneumoniae*-Isolaten (cKp-Isolate; 17-0683 und 17-0684), zwei ESBL-bildenden cKp-Isolaten (ESBL-cKp-Isolate; 16-0382 und 16-0383) und zwei hypervirulenten *K. pneumoniae*-Isolaten (hvKp-Isolate; 17-0609 und 18-0005) zusammengestellt. Die Isolate 17-0683 und 17-0684 wurden aus Blutkulturen isoliert und sind, bis auf die für *K. pneumoniae* charakteristische Ampicillinresistenz, verursacht durch die Bildung einer SHV-Typ Beta-Laktamase, empfindlich gegenüber allen getesteten Antibiotika. Das Isolat 16-0382 stammt aus einer Urinkultur und das Isolat 16-0383 aus einem Rachenabstrich. Beide Isolate sind resistent gegenüber Drittgenerations-Cephalosporinen und besitzen das ESBL-Gen *bla*<sub>CTX-M-15</sub>. Die zwei ausgewählten hvKp Isolate 17-0609 und 18-0005 gehören den Sequenztypen ST2328 und ST66 an, zeigen Kapseltyp K2 und besitzen die Virulenzgene *ybt*, *iro*, *iuc*, *clb* und *rmpA/A2*.

#### **3.4.1. Zellmorphologische Unterschiede klinischer *K. pneumoniae*-Isolate**

Mittels einer Tuschefärbung und Lichtmikroskopie Abbildung 13 wurden die sechs *K. pneumoniae*-Isolate 16-0382, 16-0383, 17-0683, 17-0684, 17-0609 und 18-0005 hinsichtlich möglicher zellmorphologischer Unterschiede analysiert. Anhand der mikroskopischen Aufnahmen wurde die bereits für hvKp beschriebene, dicke Kapselschicht, die sich als deutlicher weißer Halo um die Bakterienzellen darstellt, beobachtet. Darüber hinaus wurden deutliche Unterschiede der Zelllänge der hvKp im Vergleich zu den cKp- und den ESBL-cKp-Isolaten festgestellt.



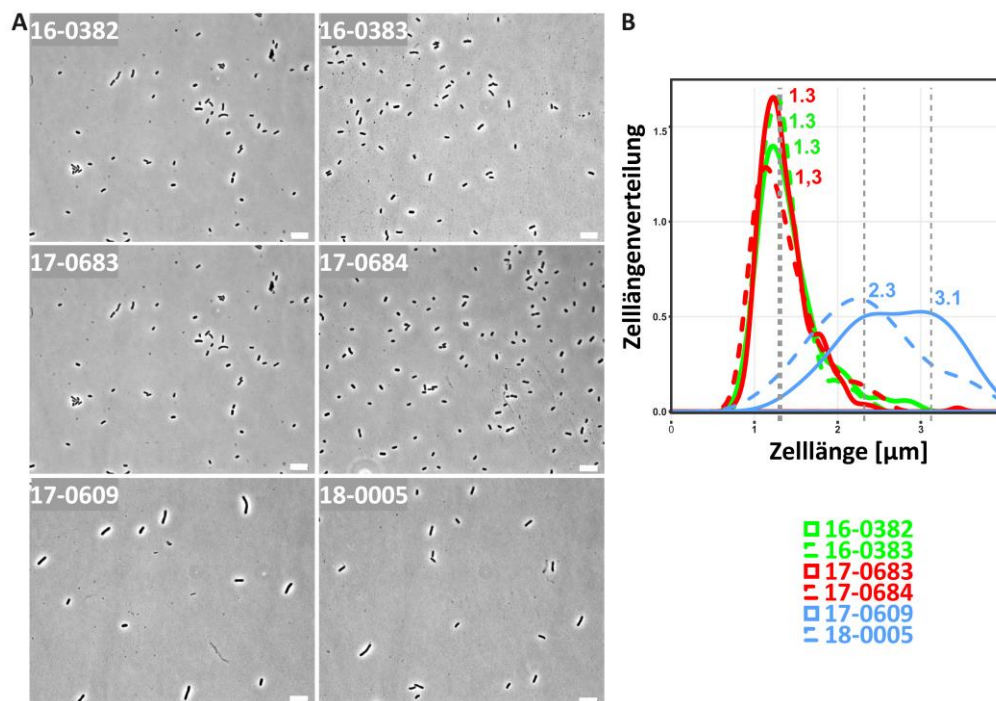
**Abbildung 13: Zellmorphologische Unterschiede von cKp-, ESBL-cKp- und hvKp-Isolaten unter Normoxie.** (A) Lichtmikroskopische Aufnahmen von cKp- (17-0683 und 17-0684), ESBL-cKp- (16-0382 und 16-0383) und hvKp-Isolaten (17-0609 und 18-0005) zeigen einen Unterschied in der Kapseldicke und Zelllänge. (B) Dargestellt ist die Verteilung der Zelllängen der untersuchten *K. pneumoniae*-Isolate. Mittels *MicrobeJ* wurden von jedem Stamm Triplikate mit jeweils 100 Zellen vermessen, mit *R* ausgewertet und visualisiert.

Wie in Abbildung 13 A zu erkennen ist, sind die Zellen der hvKp-Isolate länger und haben eine filamentöse Form, während die cKp- und ESBL-cKp-Isolate eine für Bakterien der Familie *Enterobacteriaceae* typische Stäbchenform aufweisen. Um dieses Ergebnis zu quantifizieren wurden die mikroskopischen Aufnahmen mit dem Programm *MicrobeJ*, das die Zelllängenverteilung bestimmt, und mittels der Software *R* ausgewertet und visualisiert. Dabei wurde ersichtlich, dass die durchschnittliche Zelllänge von hvKp-Isolaten länger ist als die der cKp- und ESBL-cKp-Isolate. Das hvKp-Isolat 18-0005 besaß längere Zellen als das hvKp-Isolat 17-0609. Diese erhöhte Zelllänge von 18-0005 lässt vermuten, dass der Regulator RmpA/RmpA2 einen Einfluss auf die Länge der Bakterienzellen hat. Während 17-0609 nur *rmpA* besitzt, wurde für 18-0005 sowohl *rmpA* als auch *rmpA2* nachgewiesen [146, 147].

### 3.4.2. Zellmorphologische Veränderungen von *K. pneumoniae* unter Sauerstoffreduktion

*K. pneumoniae* ist ein fakultativ anaerobes Bakterium, das optimal in Gegenwart von Sauerstoff wächst, aber auch Sauerstoffarmut wie im Darm tolerieren kann. Für *E. coli* konnte bereits gezeigt

werden, dass sie auf Sauerstoffreduktion mit einer Filamentierung reagieren und dies einen Einfluss auf die Pathogenese des Erregers hat [159]. Daher sollte untersucht werden, ob unter Sauerstoffreduktion ebenfalls zellmorphologische Veränderungen für *K. pneumoniae* beobachtet werden können. Dazu wurden die zu untersuchenden Isolate über Nacht bei einer Sauerstoffkonzentration von 0,5 Vol% kultiviert und anschließend mikroskopisch ausgewertet. Wie in Abbildung 14 dargestellt, wurde in lichtmikroskopischen Aufnahmen und durch Zelllängenmessungen für alle drei Pathotypen eine Elongation der Bakterienzellen beobachtet.



**Abbildung 14: Zellmorphologische Unterschiede von cKp-, ESBL-cKp- und hvKp-Isolaten unter Hypoxie.** (A) Lichtmikroskopische Aufnahmen von cKp- (17-0683 und 17-0684), ESBL-cKp- (16-0382 und 16-0383) und hvKp-Isolaten (17-0609 und 18-0005) zeigen einen Unterschied in der Kapseldicke und Zelllänge. (B) Dargestellt ist die Verteilung der Zelllängen der untersuchten *K. pneumoniae*-Isolate. Mittels *MicrobeJ* wurden von jedem Stamm Triplikate mit jeweils 100 Zellen vermessen, mit *R* ausgewertet und visualisiert.

Wie zuvor unter Normoxie waren die Bakterienzellen der hvKp-Isolate länger als die der cKp- und ESBL-cKp-Isolate. Die Ergebnisse zeigen eine veränderte Zelllänge von *K. pneumoniae* in Abhängigkeit von Sauerstoff. Aufgrund der Ähnlichkeit zu *E. coli* bei O<sub>2</sub>-abhängigen Längenverteilungen kann geschlussfolgert werden, dass Sauerstoff ebenfalls einen Einfluss auf die Pathogenese/Virulenz von *K. pneumoniae* besitzt.

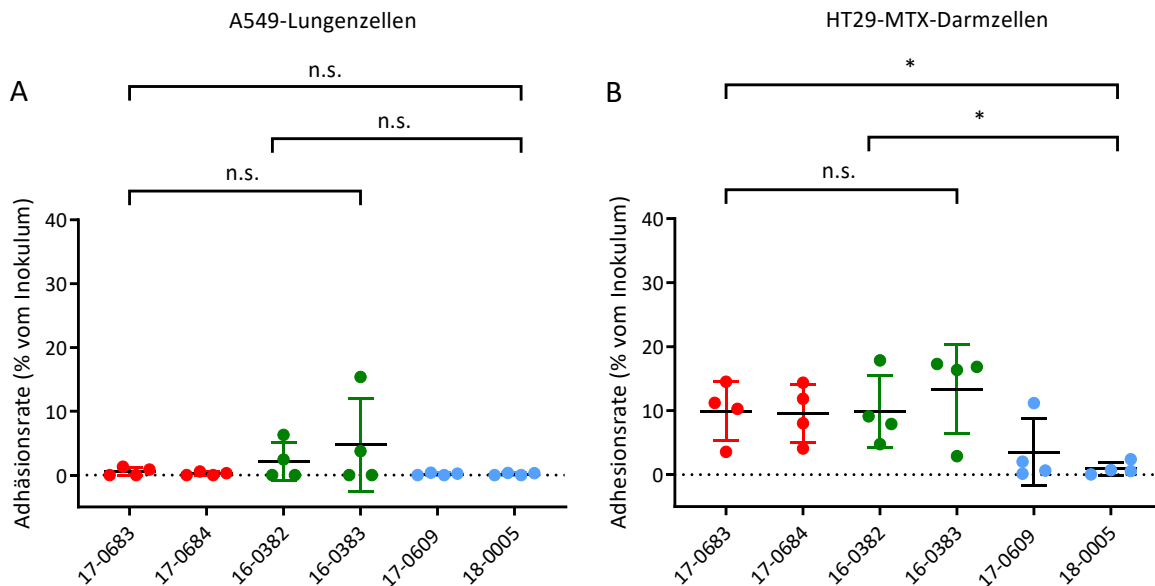
### 3.4.3. Zellinfektionsexperimente

Zur Untersuchung von *K. pneumoniae*-Wirts-Interaktionen wurde für diese Arbeit ein vergleichender Ansatz gewählt, in dessen Rahmen erfolgte die Infektion von Epithel- und Makrophagen-ähnlichen Zelllinien aus Mäusen und dem Menschen. Zunächst wurde das Adhäsionsverhalten von *K. pneumoniae*-Isolaten untersucht. Anschließend erfolgte der Vergleich der Invasion und intrazellulären Replikation in Makrophagen-Zelllinien.

#### 3.4.3.1. Vergleich des *in vitro* Adhäsionsverhalten von klinischen *K. pneumoniae*-Isolaten

Untersuchungen haben gezeigt, dass elongierte Bakterienzellen aufgrund ihrer vergrößerten Zelloberfläche *in vitro* besser an Epithelzellen adhärieren können [160]. Wie unter 3.4.1 und 3.4.2 beschrieben, haben die Bakterienzellen von hvKp-Isolaten eine filamentöse Form. Im Folgenden wurde untersucht, ob ein Unterschied in der Adhäsion zwischen den verschiedenen *K. pneumoniae*-Pathotypen zu beobachten ist.

*K. pneumoniae* kolonisiert den Respirationstrakt und den Darmtrakt. Daher wurden als *in vitro* Zellmodel die Lungenzelllinie A549 ( $3 \times 10^4$  Zellen pro Kavität; MOI 100) und die Darmzelllinie HT29-MTX ( $3 \times 10^4$  Zellen pro Kavität; MOI 25) gewählt. In Abbildung 15 sind die Adhäsionsraten, prozentual bezogen auf das Inokulum, gezeigt. Die untersuchten *K. pneumoniae*-Isolate adhärerten *in vitro* schlechter an A549-Lungenzellen als an HT29-MTX-Darmzellen. Die Adhäsionsrate betrug unter 5% (Abbildung 15 A). Des Weiteren wurden keine Unterschiede in der Adhäsionsfähigkeit zwischen den unterschiedlichen *K. pneumoniae*-Pathotypen an A549-Lungenzellen beobachtet. Obwohl die Standardabweichung aufgrund schwankender Adhäsionsraten in den einzelnen Experimenten groß war, konnte anhand der Daten ein Trend erkannt werden (Abbildung 15 B). Die untersuchten cKp- und ESBL-cKp-Isolate zeigten im *in vitro* Zellkulturmodel eine höhere Adhäsionsrate (etwa 10% vom Inokulum) an Darmzellen, als an Lungenzellen. Die Adhäsionsrate von hvKp-Isolaten war dagegen signifikant geringer, die Adhäsionsrate betrug auch hier  $< 5\%$ . Die mit Hilfe der verwendeten Infektionsmodellen erzielten Resultate weisen auf keinen positiven Einfluss der Zellmorphologie auf die Adhäsionsfähigkeit hin.

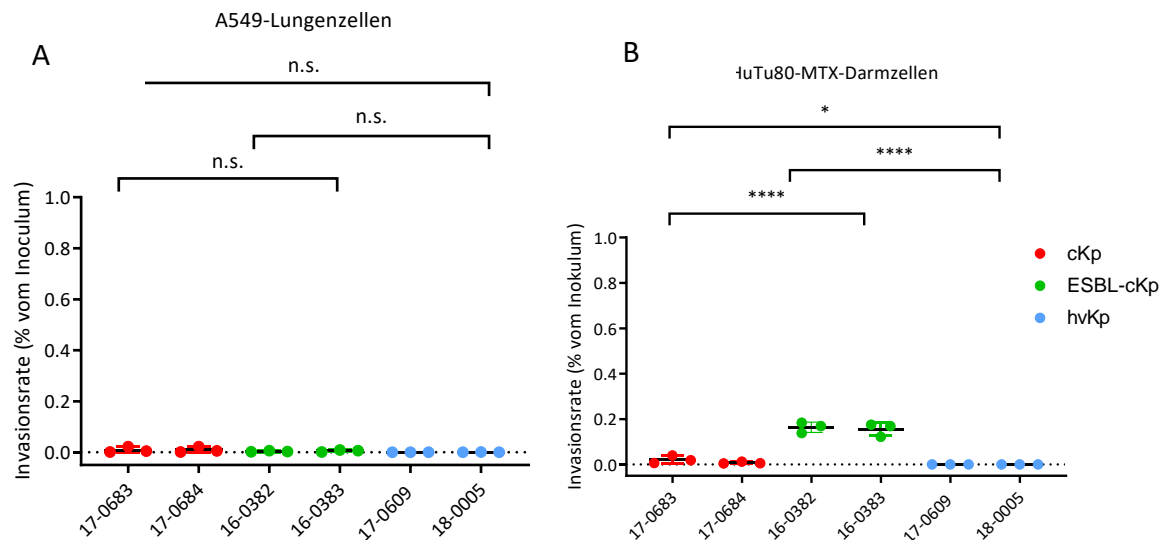


**Abbildung 15: Quantifizierung der Adhäsion von *K. pneumoniae*-Stämmen an A549- und HT29-MTX-Zellen.** Dargestellt ist die Adhäsion der cKp- (17-0683 und 17-0684), ESBL-cKp- (16-0382 und 16-0383) und hvKp-Isolate (17-0609 und 18-0005) an (A) A549-Lungenzellen und (B) HT29-MTX-Darmzellen prozentual bezogen auf das Inokulum. Die Daten repräsentieren die Ergebnisse aus vier biologisch unabhängigen Triplikaten. Zur Berechnung der Signifikanz zwischen den Gruppen wurde ANOVA auf die Daten angewendet. Die statistische Signifikanz ist wie folgt angegeben: n.s. nicht signifikant, \* $P \leq 0,05$

### 3.4.3.2. Vergleich der zellulären Invasion *in vitro* von klinischen *K. pneumoniae*-Isolaten

Weiterhin sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob ein Unterschied in der zellulären Invasion zwischen den verschiedenen *K. pneumoniae*-Pathotypen zu beobachten ist. Zur Ermittlung der zellulären Invasion wurden als Zellmodell die Lungenzelllinie A549 ( $3 \times 10^4$  Zellen pro Kavität; MOI 100) und die Darmzelllinie HuTu80 ( $3 \times 10^4$  Zellen pro Kavität; MOI 50) gewählt. In der Abbildung 16 sind die Invasionsraten, prozentual bezogen auf das Inokulum, dargestellt. Die untersuchten *K. pneumoniae*-Isolate zeigten *in vitro* eine sehr geringe Invasion (Invasionsrate  $<1\%$ ) in A549-Lungenzellen (Abbildung 16 A) und HuTu80-Darmzellen (Abbildung 16 B). Wie zuvor im Vergleich der Adhäsion konnten auch hier keine signifikanten Unterschiede zwischen den unterschiedlichen *K. pneumoniae*-Pathotypen hinsichtlich der Invasion in A549-Lungenzellen festgestellt werden. Jedoch wurden Unterschiede in den ermittelten Invasionsraten im Zellkulturmodell mit HuTu80-Darmzellen beobachtet. Hier zeigten ESBL-cKp-Isolate eine signifikant höhere Invasionsrate als cKp- und hvKp-Isolate. Die mit Hilfe der verwendeten Infektionsmodelle erzielten

Resultate zeigten keine gesteigerte zelluläre Invasion der untersuchten hvKp-Isolate. Jedoch konnte die von *Sahley et al.* beschriebene erhöhte Invasion von ESBL-cKp bestätigt werden [141].

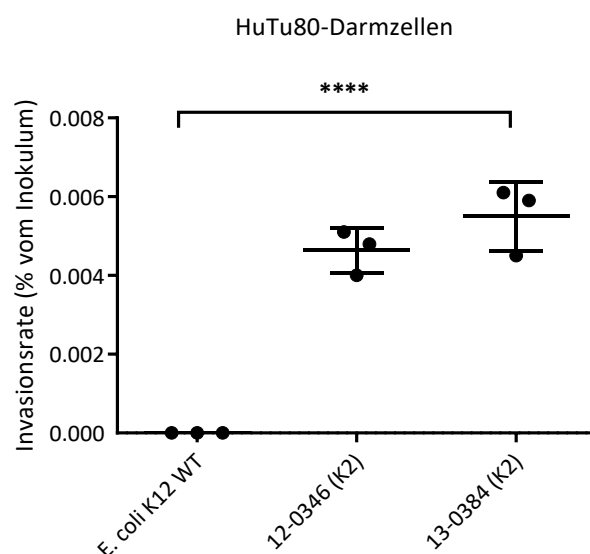


**Abbildung 16: Quantifizierung der Invasion von *K. pneumoniae*-Stämmen in A549- und HuTu80-Zellen.** Dargestellt ist die Invasion der cKp- (17-0683 und 17-0684), ESBL-cKp- (16-0382 und 16-0383) und hvKp-Isolate (17-0609 und 18-0005) in (A) A549-Lungenzellen und (B) HuTu80-Darmzellen bezogen auf das Inokulum. Die Daten repräsentieren die Ergebnisse aus drei biologisch unabhängigen Triplikaten. Zur Berechnung der Signifikanz zwischen den Gruppen wurde ANOVA auf die Daten angewendet. Die statistische Signifikanz ist wie folgt angegeben: n.s. nicht signifikant, \* $P \leq 0,05$ , \*\*\*\* $P \leq 0,0001$

### 3.4.3.3. Untersuchung des Einflusses von ESBL-Gen-tragenden Plasmiden auf nicht-invasive *E. coli*

Im Folgenden sollte die unter 3.4.3.2 beobachtete gesteigerte Invasion von ESBL-cKp genauer untersucht werden. Im Rahmen einer Studie zur Untersuchungen der bakteriellen Fitness nach dem Erwerb von Beta-Laktamase kodierenden Plasmiden wurden die *E. coli* K12 J53 Derivate 12-0346 (K2) (Plasmid IncL/M1, 60 kb mit *bla*<sub>OXA-48</sub>) sowie 13-0384 (K2) (IncFIIK, 110 kb mit *bla*<sub>NDM</sub>) generiert [148]. Zur Charakterisierung des Einflusses von Beta-Laktamase kodierenden Plasmiden auf die zelluläre Invasion wurden diese Transkonjuganten mit dem nicht invasiven *E. coli* K12 J53 Wildtyp (Rezipient) im Zellkulturmodell untersucht. Auch hier wurde zur Ermittlung der zellulären Invasion die Darmzelllinie HuTu80 ( $3 \times 10^4$  Zellen pro Kavität; MOI 50) gewählt. Wie in der Abbildung 17 dargestellt, konnte erwartungsgemäß keine Invasion für den Wildtyp Stamm beobachtet werden. Die beide Plasmid-tragenden Derivate 12-0346 und 13-0384 zeigten hingegen einen signifikanten Unterschied im Invasionsverhalten. Weiterhin wurde kein signifikanter Unterschied

der Invasionsfähigkeit zwischen den Derivaten festgestellt. Dies lässt vermuten, dass der Einfluss auf die Invasionsfähigkeit unabhängig von der Plasmidgröße oder dem Replikontyp ist. Anhand des verwendeten Infektionsmodells konnten die Beobachtungen aus 3.4.3.2 bestätigt werden.



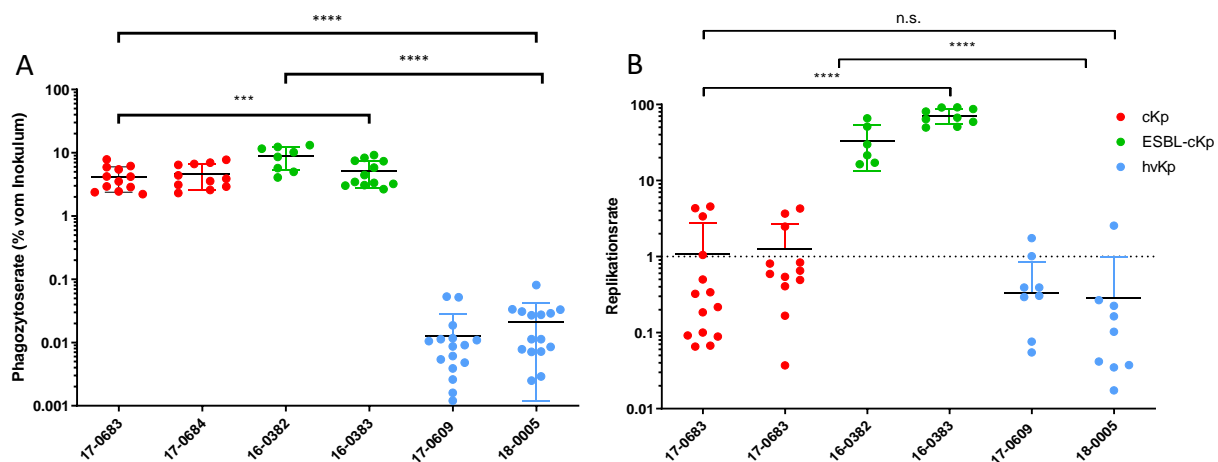
**Abbildung 17: Quantifizierung der Invasion von *E. coli*-Stämmen in HuTu80-Zellen.** Dargestellt ist die Invasion von *E. coli* K12 Wildtyp (WT) und dessen Plasmid-tragenden Derivaten 12-0346 (K2) (Plasmid IncL/M1, 60 kb mit *bla*<sub>OXA-48</sub>) und 13-0384 (K2) (Plasmid IncFIIK, 110 kb mit *bla*<sub>NDM</sub>) in HuTu80-Darmzellen bezogen auf das Inokulum. Die Daten repräsentieren die Ergebnisse aus drei biologisch unabhängigen Triplikaten. Zur Berechnung der Signifikanz zwischen den Gruppen wurde ANOVA auf die Daten angewendet. Die statistische Signifikanz ist wie folgt angegeben: \*\*\*\*P ≤ 0,0001.

#### 3.4.3.4. Vergleich der *in vitro* Phagozytose von klinischen *K. pneumoniae*-Isolaten

In dem folgenden *in vitro* Infektionsmodell mit murinen RAW 264.7-Mausmakrophagen wurde die Interaktion der sechs *K. pneumoniae*-Isolate 16-0382, 16-0383, 17-0683, 17-0684, 17-0609 und 18-0005 mit Phagozyten charakterisiert. Ziel war es, mögliche Unterschiede in der Phagozytoseresistenz zwischen den verschiedenen *K. pneumoniae*-Pathotypen zu beschreiben. Dazu wurde zunächst die Phagozytoserate der verschiedenen *K. pneumoniae*-Stämme verglichen. Nach einer einstündigen Infektion wurde die Anzahl der intrazellulären Bakterien bestimmt. Die Phagozytoserate wurde dabei bezogen auf das Inokulum berechnet. In Abbildung 18 A ist die Phagozytoserate der *K. pneumoniae*-Stämme aus drei unabhängigen Experimenten gezeigt. Wie anhand der Abbildung ersichtlich wird, wurde ein signifikanter Unterschied in der Phagozytoserate beobachtet. Die hvKp-Isolate 17-0609 und 18-0005 wiesen *in vitro* eine signifikant geringere

Phagozytoserate im Vergleich zu cKp- (17-0683 und 17-0684) und ESBL-cKp-Isolaten (16-0382 und 16-0383) auf.

Des Weiteren sollte geklärt werden, ob die untersuchten *K. pneumoniae*-Stämme intrazellulär in RAW 264.7-Mausmakrophagen überleben und die Fähigkeit zur intrazellulären Replikation besitzen. Dazu wurde die Anzahl der intrazellulären Bakterienzellen 24 h nach der Infektion ermittelt und die Replikationsrate bezogen auf die Phagozytoserate berechnet. Wie in Abbildung 18 B gezeigt, gab es auch hier signifikante Unterschiede zwischen den *K. pneumoniae*-Pathotypen. Die Replikationsrate der hvKp-Isolate 17-0609 und 18-0005 lag unter eins. Diese Isolate wurden abgetötet. Die cKp-Isolate 17-0683 und 17-0684 wiesen eine Replikationsrate von etwa eins auf. Sie können *in vitro* in Mausmakrophagen überleben, aber sich nicht intrazellulär replizieren. Beide ESBL-cKp-Isolate zeigten *in vitro* Replikationsraten von etwa 90-fach. Sie können intrazellulär in Makrophagen persistieren und sich vermehren.

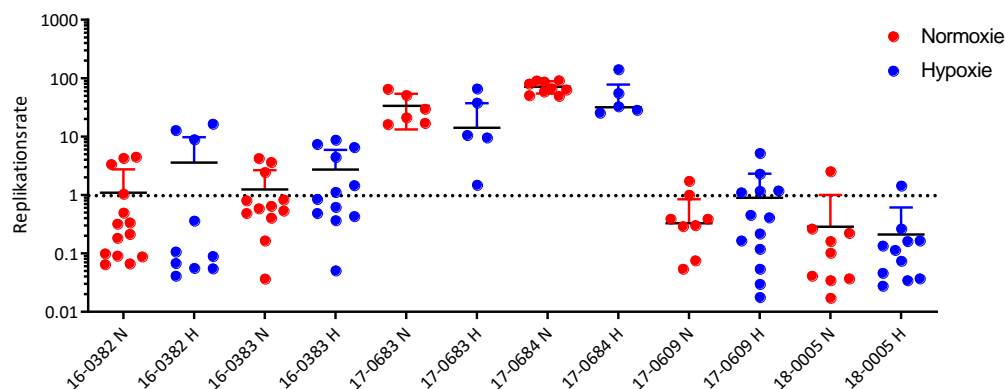


**Abbildung 18: Quantifizierung der Phagozytoseratesistenz und der intrazellulären Replikation verschiedener *K. pneumoniae*-Pathotypen.** (A) Dargestellt ist die Phagozytoserate von cKp- (17-0683 und 17-0684), ESBL-cKp- (16-0382 und 16-0383) und hvKp-Isolaten (17-0609 und 18-0005) durch murine RAW 264.7-Mausmakrophagen (60.000 Zellen/Kavität) nach einstündiger Infektion. (B) Replikationsrate von cKp- (17-0683 und 17-0684), ESBL-cKp- (16-0382 und 16-0383) und hvKp-Isolaten (17-0609 und 18-0005) in murinen RAW 264.7-Mausmakrophagen (60.000 Zellen/Kavität) nach 24-stündiger Infektion. Zur Berechnung der Signifikanz zwischen den Gruppen wurde ANOVA auf die Daten angewendet. Die statistische Signifikanz ist wie folgt angegeben: n.s. nicht signifikant, \*\*\* $P \leq 0,01$  und \*\*\*\* $P \leq 0,0001$ .



### 3.4.3.5. *In vitro* Vergleiche intrazellulärer Replikation von klinischen *K. pneumoniae*-Isolaten unter Normoxie und Hypoxie

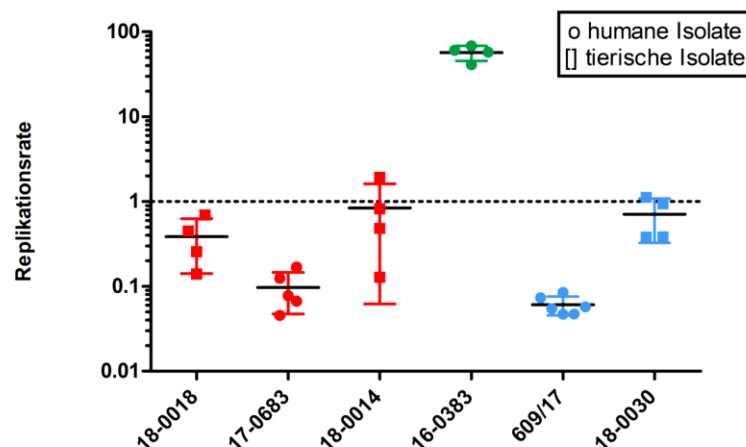
Für einige enteropathogene Bakterien wie Salmonellen konnte bereits gezeigt werden, dass eine Sauerstoffreduktion mit einer gesteigerten Virulenz des Erregers einhergeht [161]. Nachdem in lichtmikroskopischen Aufnahmen eine Filamentierung der *K. pneumoniae*-Zellen unter Sauerstoffreduktion beobachtet werden konnte, sollte an dieser Stelle untersucht werden, ob eine verringerte Sauerstoffverfügbarkeit ebenfalls einen Einfluss auf die Interaktion mit Wirtszellen der *K. pneumoniae*-Isolate hat. Dazu wurden parallel in zwei Zellkulturplatten RAW 246.7-Mausmakrophagen infiziert. Eine Zellkulturplatte wurde wie gewohnt unter Normoxie ( $O_2=20,9\%$ ) und die zweite Zellkulturplatte unter Hypoxie ( $O_2=0,5\%$ ) 24 h inkubiert. In der Abbildung 19 sind die Replikationsraten der untersuchten *K. pneumoniae*-Isolate dargestellt. Es konnte kein signifikanter Unterschied in den Replikationsraten unter Hypoxie bezogen auf Normoxie festgestellt werden. Auch hier konnten sich nur die ESBL-cKp-Isolate replizieren, während cKp-Isolate überdauerten und hvKp-Isolate abstarben. Die mit Hilfe des verwendeten Infektionsmodells erzielten Resultate zeigten *in vitro* kein attenuiertes Replikationsverhalten unter Hypoxie im Vergleich zur Replikation unter Normoxie.



**Abbildung 19: Vergleich der Replikation von klinischen *K. pneumoniae*-Isolaten in Raw 264.7-Mausmakrophagen unter Normoxie und Hypoxie.** Dargestellt sind die Replikationsraten von cKp- (17-0683 und 17-0684), ESBL-cKp- (16-0382 und 16-0383) und hvKp-Isolaten (17-0609 und 18-0005) in murinen RAW 264.7-Mausmakrophagen (60.000 Zellen/Kavität) unter Normoxie ( $O_2=20,9\%$ ; rot) und Hypoxie ( $O_2=0,5\%$ ; blau).

### 3.4.3.6. *In vitro* Vergleich intrazellulärer Replikation human- und veterinär-pathogener *K. pneumoniae*-Isolate

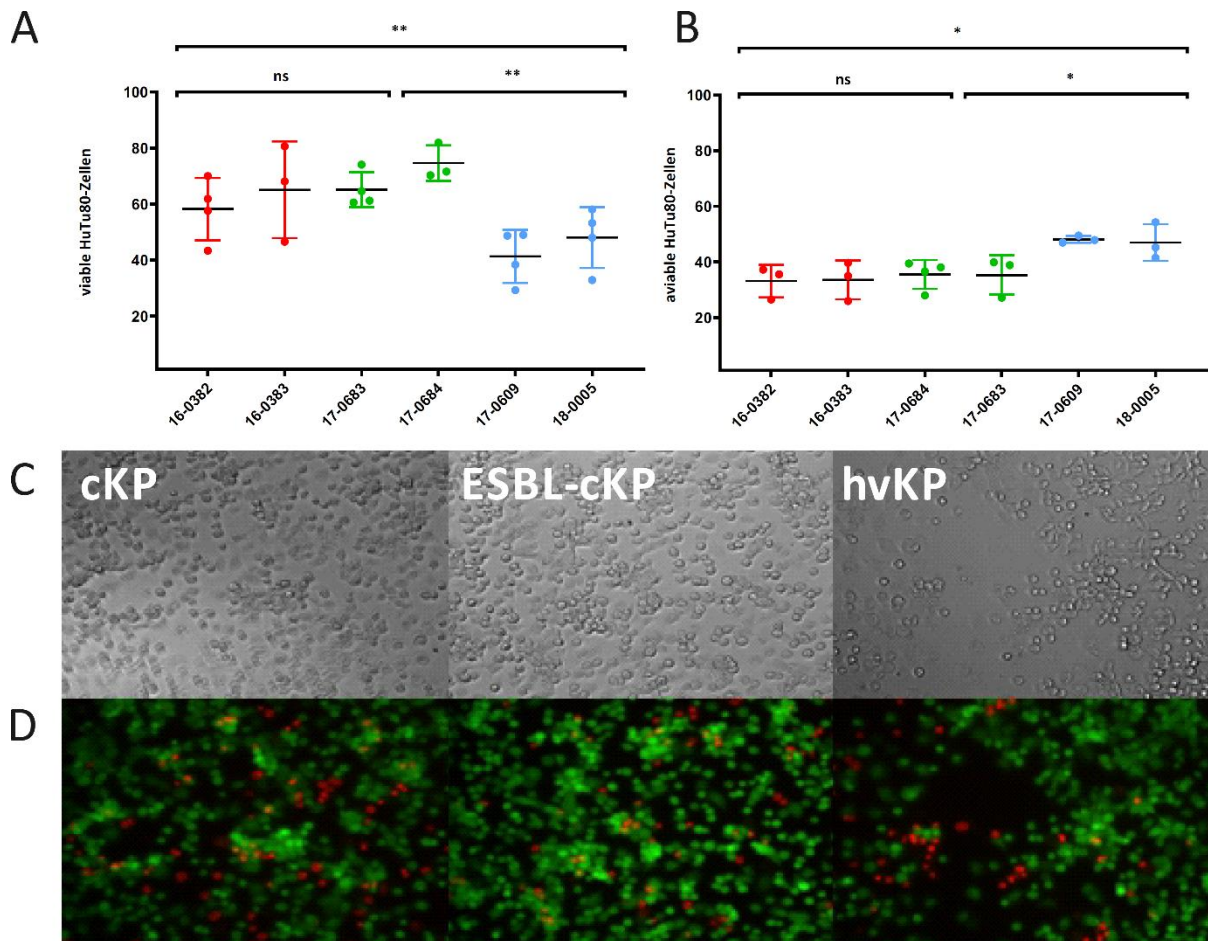
Obwohl *K. pneumoniae* zu den zoonotischen Infektionserregern zählt, werden besonders human-assoziierte *K. pneumoniae*-Linien in Infektionsmodellen untersucht. Die Stammsammlung der Arbeitsgruppe Multiresistente Gram-negative Erreger umfasst neben klinischen *K. pneumoniae*-Isolaten auch veterinär-pathogene Isolate. Im Folgenden wurden *K. pneumoniae*-Isolate aus Human- und Tierinfektionen im Zellkulturmodell mit RAW-Mausmakrophagen verglichen. Ziel war es, zu untersuchen ob intrazelluläre Persistenz und Vermehrungsfähigkeit von *K. pneumoniae* in Makrophagen wirtsspezifisch sind. In Abbildung 20 sind die Replikationsraten der untersuchten Isolate, prozentual bezogen auf das Inokulum, gezeigt. Die Tierisolate verhielten sich in den Makrophagen äquivalent zu den Humanisolaten. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass die Fähigkeit zur intrazellulären Persistenz und Vermehrung bei *K. pneumoniae* wirtsunspezifisch ist.



**Abbildung 20: Vergleich der Replikation von human- und veterinär-pathogenen *K. pneumoniae*-Isolaten in Raw 264.7-Mausmakrophagen.** Dargestellt sind die Replikationsraten der Patientenisolate 16-0383, 17-0683 und 17-0609 sowie der Tierisolate 18-0014, 18-0018 und 18-0030 in murinen RAW 264.7-Mausmakrophagen (60.000 Zellen/Kavität; MOI 5). Die Zuordnung der Isolate ist farblich gekennzeichnet; cKp, rot; ESBL-cKp, grün; hvKp, blau)

### 3.4.3.7. Vergleich zytotoxischer Effekte von klinischen *K. pneumoniae*-Isolaten

Wie unter 3.4.3.2 beschrieben, konnte für hvKp-Isolate keine zelluläre Invasion in Darmzellen beobachtet werden. Allerdings hatten Studien von *Cano et al.* einen zytotoxischen Effekt von *K. pneumoniae* auf Epithelzellen gezeigt [125]. Daher sollte im Folgenden untersucht werden, ob die *K. pneumoniae*-Isolate 16-0382, 16-0383, 17-0683, 17-0684, 17-0609 und 18-0005 einen zytotoxischen Effekt auf Darmzellen aufweisen.



**Abbildung 21: Vergleich des zytotoxischen Effekts von *K. pneumoniae* auf HuTu80-Darmzellen.** Dargestellt ist der prozentuale Anteil lebender (A) und nicht-lebender (B) HuTu80-Darmzellen nach der Infektion mit cKp- (17-0683 und 17-0684), ESBL-cKp- (16-0382 und 16-0383) und hvKp-Isolaten (17-0609 und 18-0005). Die Daten repräsentieren die Ergebnisse von Triplikaten aus drei unabhängigen Experimenten. Zur Berechnung der Signifikanz zwischen den Gruppen wurde ANOVA auf die Daten angewendet. Die statistische Signifikanz ist wie folgt angegeben: \* $P \leq 0,05$  und \*\* $P \leq 0,01$ . (C) Durchlichtmikroskopische und (D) fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen lebender (grün) und nicht-lebender (rot) HuTu80-Darmzellen nach der Infektion mit *K. pneumoniae*.

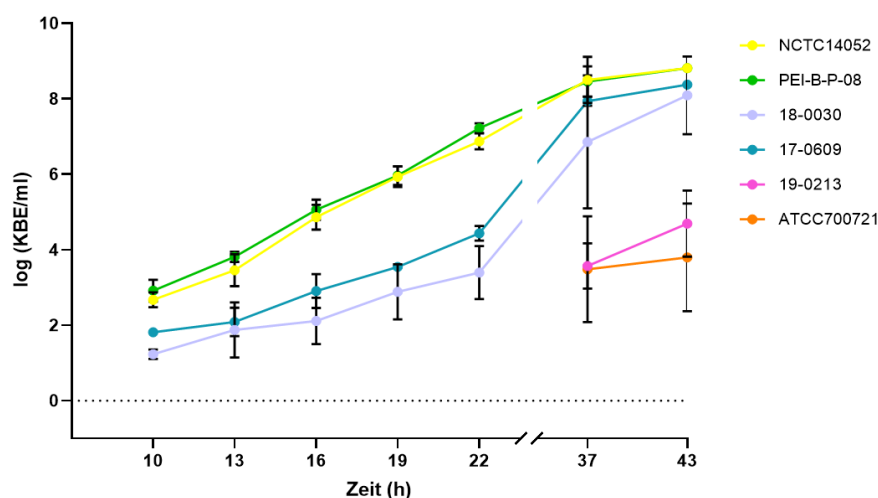
Dazu wurden HuTu80-Darmzellen, wie zuvor beschrieben, mit den *K. pneumoniae*-Isolaten infiziert. Zur Diskriminierung von lebenden und nicht-lebenden HuTu80-Zellen wurde eine Lebend-Tod-

Färbung mit Calcein AM (viabel) und Ethidiumbromid (aviabel) angeschlossen, welche sowohl photometrisch als auch mikroskopisch ausgewertet wurden. In der Abbildung 21 sind die ermittelten prozentualen Anteile viabler und non-viabler HuTu80-Zellen abgebildet. Sowohl cKp-, ESBL-cKp- als auch hvKp-Isolate zeigten *in vitro* eine zytotoxische Wirkung auf Darmzellen. Die Viabilität der HuTu80-Zellen betrug nach der Infektion bei allen Pathotypen unter 80% und der prozentuale Anteil der non-viablen Zellen lag über 20%. Hypervirulente Isolate zeigten *in vitro* einen stärkeren zytotoxischen Effekt als cKp- und ESBL-cKp-Isolate. Mikroskopische Aufnahmen von Zellinfektionen mit hvKp-Isolaten zeigten den Verlust der Integrität des HuTu80-Monolayers, wohingegen nach Infektionen mit cKp- und ESBL-cKp-Isolaten ein konfluenter Zellrasen bestehen blieb (Abbildung 21 C).

#### 3.4.4. Wachstum in Thrombozytenkonzentraten

Eine der zentralen Aufgaben des Paul-Ehrlich-Institut (PEI) ist die Qualitätssicherung von Blutprodukten und *in vitro* Diagnostika. Zur Validierung von Nachweismethoden von bakteriellen Kontaminationen verfügt das PEI über Referenzstämme, die weltweit zur Testung von Blutprodukten wie Thrombozytenkonzentraten genutzt werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das Wachstumsverhalten verschiedener *K. pneumoniae*-Isolate, welche unterschiedliche Siderophore besitzen (Tabelle A 4), mit dem des *K. pneumoniae* Referenzstamms PEI-B-P-08 [145] in Thrombozytenkonzentraten (TK) verglichen. Dazu wurde je ein 50 ml Thrombozytenkonzentrat mit 10 KBE eines der zu untersuchenden *K. pneumoniae*-Isolate gespiked und unter Bedingungen, die durch Hämotherapie-Richtlinien vorgegeben sind, inkubiert. In Abbildung 22 sind die Wachstumskinetiken der untersuchten *K. pneumoniae*-Isolate über einen Zeitraum von 43 h gezeigt. Für die Isolate NCTC14052, PEI-B-P-08, 18-0030 und 17-0609 wurde ein Anstieg der Keimzahl nach 10 h beobachtet, wobei die Keimzahl der Isolate NCTC14052 und PEI-B-P-08 um eine Zehnerpotenz höher waren, als die der Isolate 18-0030 und 17-0609. Weiterhin war das Wachstum der Isolate NCTC14052 und PEI-B-P-08 exponentiell, während das Wachstum der Isolate 18-0030 und 17-0609 einen eher linearen Anstieg aufwies. Nach 37-43 h befand sich das Wachstum der Isolate NCTC14052, PEI-B-P-08, 18-0030 und 17-0609 mit Keimzahlen von etwa  $10^7$  in der stationären Phase. Die Isolate 19-0213 und ATCC700721 wiesen eine lange lag-Phase von über 22 h auf. Erst nach 38 h konnte für diese Isolate ein

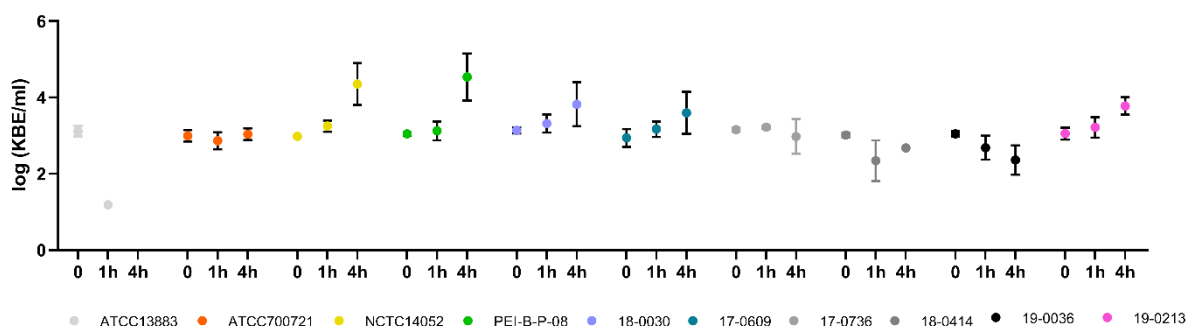
deutlicher Anstieg der Keimzahlen detektiert werden. Vier der untersuchten Isolate (ATCC18338, 17-0736, 18-0414 und 19-0036) konnten nicht in Thrombozytenkonzentraten wachsen. Dieses Wachstumsverhalten könnte durch unterschiedliche Serumresistenzen bedingt sein [132].



**Abbildung 22: Vergleich des Wachstumsverhaltens von *K. pneumoniae*-Isolaten in Thrombozytenkonzentraten.** Dargestellt sind die Wachstumskurven der *K. pneumoniae*-Isolate ATCC700721, NCTC14052, PEI-B-P-08, 17-0609, 18-0030 und 19-0213 bei 22,5 °C in Thrombozytenkonzentraten. Die Wachstumskurven für ATCC13883, 17-0736, 18-0414 und 19-0036 sind nicht dargestellt, da diese Isolate in den Thrombozytenkonzentraten nicht wuchsen. Die Daten repräsentieren die Ergebnisse von Triplikaten aus drei unabhängigen Experimenten.

### 3.4.5. Serumresistenz von klinischen *K. pneumoniae*-Isolaten

Um eine mögliche Serumresistenz der *K. pneumoniae*-Isolate zu untersuchen, wurde Humanserum mit  $10^3$  KBE der zu untersuchenden Isolate inokuliert.

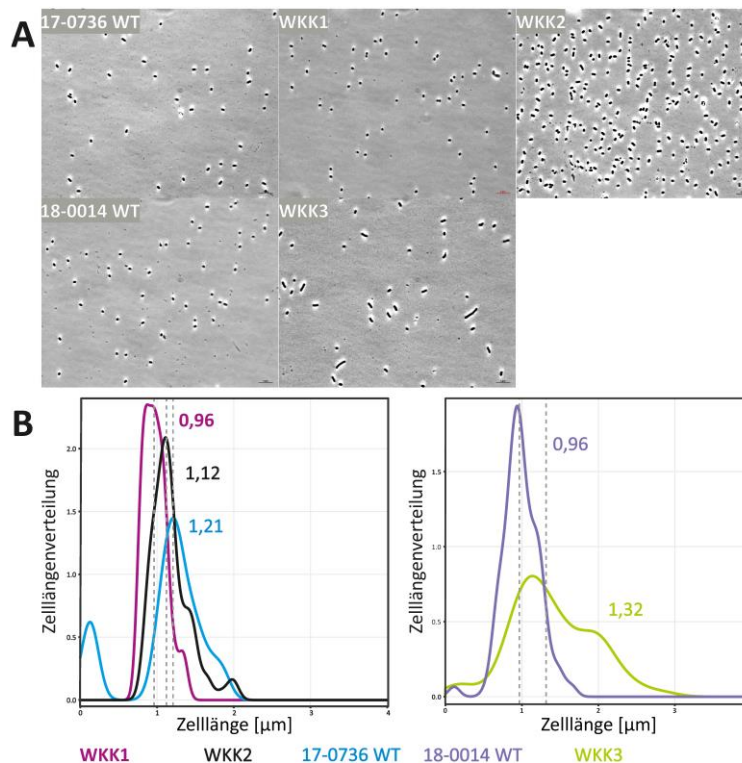


**Abbildung 23: Vergleich der Serumresistenz von *K. pneumoniae*-Isolaten.** Dargestellt ist die Serumresistenz der *K. pneumoniae*-Isolate ATCC13883, ATCC700721, NCTC14052, PEI-B-P-08, 17-0609, 17-0736, 18-0030, 18-0414, 19-0036 und 19-0213 bei 37°C in 25% Humanserum. Die Daten repräsentieren die Ergebnisse von Triplikaten aus drei unabhängigen Experimenten.

In Abbildung 23 sind die Ergebnisse der ermittelten Keimzahlen nach 1 h und 4 h gezeigt. Die Isolate ATCC18338, 17-0736, 18-0414 und 19-0036 sind nicht resistent gegenüber Humanserum, hier nahmen die Keimzahlen über 4 h ab. Die Isolate ATCC700721, NCTC14052, PEI-B-P-08, 18-0030, 17-0609 und 19-0213 waren resistent gegenüber Humanserum. Während die Keimzahlen der Isolate ATCC700721 und 19-0213 stabil blieben, wurde für die Isolate NCTC14052, PEI-B-P-08, 18-0030, 17-0609 sogar eine Zunahme der Keimzahl beobachtet.

### 3.5. Charakterisierung einer *rmpA*-Deletionsmutante

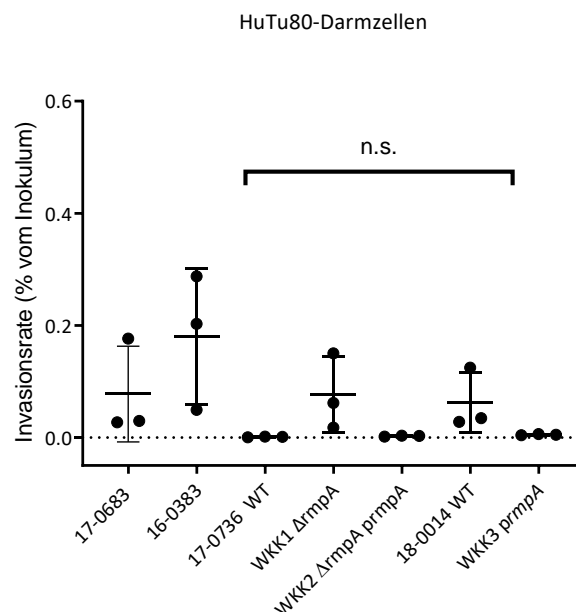
Anhand von mikroskopischen Aufnahmen wurde gezeigt, dass sich hvKp-Isolate in ihrer Zellmorphologie von cKp- und ESBL-cKp-Isolaten unterscheiden. Das *rmpA*-Gen, welches mit Hypervirulenz assoziiert wird, kodiert für einen Transkriptionsfaktor, welcher in hvKp die Transkription des *cps*-Genclusters reguliert, weshalb vermutet wurde, dass RmpA ebenfalls einen Einfluss auf die Zellmorphologie hat [142]. Zur Untersuchung dieser Hypothese wurde eine *rmpA*-Deletionsmutante in dem klinischen Isolat 17-0736 erzeugt. Das Isolat 17-0736 stammt aus einer Blutkultur. Anhand genotypischer Analysen (siehe 3.3.1) ausgehend von der rekonstruierten Genomsequenz, wurde das Isolat dem Sequenztyp ST5 und dem Kapseltyp K39 zugeordnet (Tabelle 19). Neben den erwartungsgemäß chromosomal-kodierten Genen für Yersiniabactin (*ybt*) liegen die Gene der Siderophore Salmochelins (*iro*) und Aerobactins (*iuc*) sowie *rmpA* ebenfalls chromosomal integriert (ICEKp1) vor. Zur phänotypischen Charakterisierung der *rmpA*-Deletionsmutante wurde zunächst die Zellmorphologie mittels mikroskopischer Aufnahmen und Zelllängenmessungen untersucht.



**Abbildung 24: Einfluss von *rmpA* auf die Zellmorphologie von *K. pneumoniae*.** (A) Lichtmikroskopische Aufnahmen der *K. pneumoniae*-Stämme 17-0736 (Wildtyp=WT), WKK1 (17-0736  $\Delta rmpA$ ), WKK2 (17-0736  $\Delta rmpA$  *prmpA*), 18-0014 (WT) und WKK3 (18-0014 *prmpA*) zeigten einen Unterschied in Zelllänge. (B) Dargestellt ist die Verteilung der Zelllängen der untersuchten *K. pneumoniae*-Isolate.

Wie in Abbildung 24 gezeigt, weist die *rmpA*-Deletionsmutante eine Reduktion der Zelllänge auf. Um zu zeigen, dass der filamentöse Phänotyp auf *rmpA* zurückzuführen ist, wurde ein Komplementationsstamm (WKK2  $\Delta rmpA$  *prmpA*) generiert, indem das *rmpA*-Gen unter dem Einfluss des natürlichen Promotors ektopisch vorlag. Weiterhin wurde das *rmpA*-tragende Plasmid in das Isolat 18-0014 (WT) transformiert (WKK3 *prmpA*), welches einen cKp-Stammhintergrund besitzt. Wie in Abbildung 24 dargestellt ist, konnte in dem komplementierten Stamm der Zellphänotyp des Wildtyps wiederhergestellt werden. Des Weiteren wurde eine Filamentierung der Bakterienzellen durch das Einbringen von *rmpA* für das cKp-Isolat 18-0014 beobachtet.

Zur weiteren Charakterisierung wurde im Zellkulturmodell mit HuTu80-Darmzelllinien die Fähigkeit zur zellulären Invasion dieser Isolate verglichen. Die in vorangegangenen Invasionsstudien (siehe 3.4.3.2) verwendeten Isolate 16-0383 und 17-0683 wurden als Kontrollstämme mitgeführt, um die Invasionsraten der *K. pneumoniae*-Stämme 17-0736 (WT), WKK1 (17-0736  $\Delta rmpA$ ), WKK2 (17-0736  $\Delta rmpA$  *prmpA*), 18-0014 (WT) und WKK3 (18-0014 *prmpA*) beurteilen zu können.



**Abbildung 25: Einfluss von *rmpA* auf die Invasionsfähigkeit von *K. pneumoniae* in HuTu80-Darmzellen.** Dargestellt ist die Invasionsrate der *K. pneumoniae*-Stämme 17-0683 und 16-0383 (Kontrollstämme) sowie 17-0736 (WT), WKK1 (17-0736  $\Delta rmpA$ ), WKK2 (17-0736  $\Delta rmpA$  *prmpA*), 18-0014 (WT) und WKK3 (18-0014 *prmpA*) in HuTu80-Darmzellen bezogen auf das Inokulum. Die Daten repräsentieren die Ergebnisse aus drei biologisch unabhängigen Triplikaten. n.s. nicht signifikant



In der Abbildung 25 sind die Invasionsraten, prozentual bezogen auf das Inokulum, dargestellt. Die Deletion des *rmpA*-Gens in dem hvKp-Isolat 17-0736 führte *in vitro* zu einem Anstieg der Invasion in Darmzellen, der jedoch nicht signifikant ist. Dieser Phänotyp konnte durch die Komplementierung der Deletion wieder aufgehoben werden. Darüber hinaus wurde die Invasionsfähigkeit des Isolates 18-0014 durch das Einbringen des *rmpA*-Gens reduziert. Die Ergebnisse aus den mikroskopischen Analysen und dem verwendeten Zellkulturmodell lassen darauf schließen, dass (i) *rmpA* die Zelllänge von *K. pneumoniae* beeinflusst und (ii) die Expression von *rmpA* sich *in vitro* auf die Invasionsfähigkeit auswirkt.

## 4. Diskussion

### 4.1. Genom-basierte Analysen von Tier- und Lebensmittel-assoziierten *Klebsiella* spp.-Isolaten aus Deutschland

*Klebsiella* spp. werden mit Umweltquellen und extraintestinalen Infektionen beim Tier und beim Menschen assoziiert [162]. Der Nachweis in Lebensmitteln lässt ein mögliches Reservoir für humane *Klebsiella*-Infektionen in Nutztieren vermuten, eine Übertragung von Haustieren ist ebenfalls nicht ausgeschlossen [163-168]. In der vorliegenden Arbeit wurde daher, in Zusammenarbeit mit dem Kooperationspartner BfR, eine Auswahl an *Klebsiella* spp.-Isolaten, die zufällig von verschiedenen Tieren (n=88) und Lebensmitteln (n=4) gesammelt wurden, genotypisiert, um u.a. einen Überblick über die Verteilung von *Klebsiella*-Phylogruppen zu erhalten. Die Genomanalysen dieser *Klebsiella* spp.-Isolate zeigten, dass die Unterschiede in der Speziesidentifikation von der verwendeten Methode abhängen. Neunzehn ursprünglich durch MALDI-TOF MS als *K. oxytoca* identifizierte Isolate wurden durch die WGS-basierte Analyse als *K. grimontii* (n=10) und *K. michiganensis* (n=9) reklassifiziert. Alle *K. grimontii*-Genome enthielten das Beta-Laktamase-Gen *bla*<sub>OXY-6</sub>, das für diese *Klebsiella*-Spezies spezifisch ist [169, 170]. Obwohl die MALDI-TOF MS in veterinärmedizinischen und medizinisch-mikrobiologischen Laboratorien häufig eingesetzt wird, hängt das Auflösungsvermögen von der zugrundeliegenden Datenbank ab, die aus diesem Grund kontinuierlich kuratiert und aktualisiert werden muss. WGS-basierte Analysen bieten dahingegen derzeit eine deutlich höhere Genauigkeit für die Speziesdiagnostik [14, 171, 172]. In Kongruenz mit früheren Studien wurde ein erheblicher Anteil der Studienisolate (n = 67, 71,3 %) als *K. pneumoniae sensu stricto* klassifiziert, was auf eine größere Prävalenz auch im veterinärmedizinischen Kontext hindeutet, wo solche Isolate als Lebensmittelkolonisierer oder als Infektionserreger unter Nutztieren auftreten können [162, 173, 174].

Frühere Studien haben gezeigt, dass sowohl humane *K. pneumoniae*-Isolate als auch Pflanzen-, Tier- und Umweltisolate genetisch und phänotypisch vielfältig sind [7]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ebenfalls eine hohe Diversität der Sequenztypen von *K. pneumoniae*-Isolaten aus Tieren und Nahrungsquellen beobachtet, insgesamt wurden 62 verschiedene Sequenztypen nachgewiesen. In den vergangenen Jahren wurden vereinzelt international verbreitete

Sequenztypen wie ST11, ST15, ST23 und ST25 aus Nutz- und Haustieren isoliert [164-166]. In der verwendeten Stammsammlung waren die human-assoziierten Sequenztypen ST11 und ST147 mit je einem Isolat von einem Schwein bzw. einem Rind vertreten. Da diese STs häufig mit Humaninfektionen verbunden werden, liegt die Vermutung nahe, dass sie vom Menschen auf das Tier übertragen wurden.

Die Heterogenität der ermittelten Sequenz- und Kapseltypen ist ein gutes Abbild der genetischen Diversität der *K. pneumoniae*-Isolate in dieser Studie. Anhand der ermittelten Daten konnte keine erfolgreiche Verbreitung einzelner klonaler Linien unter den untersuchten Tieren beobachtet werden, zumindest für Arten wie Schwein und Rind, die durch mehrere Proben vertreten waren.

Die Resistenz gegenüber Ampicillin war in der Stammsammlung erwartungsgemäß hoch, bedingt durch die intrinsischen  $\beta$ -Laktamase-Gene von *Klebsiella* spp. (*bla<sub>SHV</sub>*, *bla<sub>OXY</sub>*, *bla<sub>OKP</sub>*, *bla<sub>LEN</sub>*). Es wird angenommen, dass der Einsatz von Antibiotika in der Veterinärmedizin das Risiko von antibiotikaresistenten Bakterien erhöht, die auf den Menschen übertragen werden können [175]. Insbesondere *E. coli* mit ESBL-vermittelter Resistenz gegen Cephalosporine der dritten Generation und MCR-1-vermittelter Colistin-Resistenz wurden in den letzten Jahren aus Viehbeständen und Lebensmitteln gemeldet [176-179]. Für insgesamt 16 Isolate der Stammsammlung wurden ESBL-Gene nachgewiesen, aber nur fünf Isolate mit *bla<sub>CTX-M</sub>*-Genen zeigten auch eine Resistenz gegen Cefotaxim. In den verbleibenden elf Isolaten konnte eine Mutation im Promotor der *bla<sub>SHV-27</sub>*- und *bla<sub>SHV-41</sub>*-Gene nachgewiesen werden, was eine schwache Genexpression und einen non-ESBL-Phänotyp bedingt [153]. Basierend auf diesen Ergebnissen gab es keine Hinweise darauf, dass die untersuchten Nutz- und Wildtiere aktuell als Reservoir von Carbapenem-Resistenzen unter *K. pneumoniae*-Stämmen fungieren. Eine Resistenz gegen Colistin wurde nur bei einem der untersuchten *Klebsiella*-Stämme (ST11) von einem Schwein festgestellt. Ursächlich dafür war allerdings nicht MCR-1, wie häufig bei *E. coli* aus Nutztieren gefunden [178, 180]; stattdessen wurde eine Mutation im chromosomalen *mrgB*-Gen detektiert. Veränderungen im *mrgB*-Gen wurden bereits in der Literatur als Ursache für Colistin-Resistenz bei *K. pneumoniae* beschrieben [181]. MrgB ist ein Repressor des PhoPQ-Zweikomponentensystems. Mutationen in *mrgB* resultieren somit in einer Überexpression des Zweikomponentensystems, welches die Modifikation von Lipopolysacchariden steuert und die Empfindlichkeit gegenüber Colistin beeinflusst [182-184].

Ein Screening nach Virulenzgenen ergab deren Vorhandensein nur in *K. pneumoniae*-Isolaten (n=22). Interessanterweise wurde das Gen *iuc*, das für das Siderophor Aerobactin kodiert, mit *K. pneumoniae*-Isolaten aus Schweinen assoziiert (Tabelle A 1). Obwohl sich diese 18 Isolate in ihren Sequenz- und Kapseltypen unterschieden, trugen alle das *iuc3*-Gen. Die *iuc* Stammlinie 3 ist mit den selbstübertragbaren IncFIB<sub>K</sub>- und IncFII<sub>K</sub>-Virulenzplasmiden assoziiert [185].

Für das Isolat 30312\_2 erfolgte eine MinION-Sequenzierung. Mittels der Kombination von Illumina- und MinION-Sequenzdaten wurde ein 171 kb Plasmid rekonstruiert, welches *iuc3* trug. In Sequenzanalysen wurden in allen *iuc3*-positiven Isolaten die Replikontypen *iuc3*-tragender Plasmide detektiert. Nach Maßgabe dieser Beobachtungen ist davon auszugehen, dass Hausschweine ein Reservoir für *K. pneumoniae* mit *iuc3* auf Plasmiden bilden. Auch wenn die Ergebnisse dieser Arbeit bereits einen starken Hinweis liefern, sollten für einen faktischen Beleg weitere Studien mit einem größeren Probenumfang diese Hypothese bestätigen.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Populations-Untersuchung von *Klebsiella* spp. hat eine hohe Prävalenz des Infektionserregers *K. pneumoniae* in Tieren und Lebensmitteln gezeigt. Die starke Verbreitung der Spezies und der Nachweis humanpathogener Linien lässt die Möglichkeit der Transmission zwischen Menschen und Tieren vermuten, wobei die exakten Transmissionswege noch unklar bleiben. Während die vorliegenden Daten ein tierisches Reservoir für multiresistente *K. pneumoniae* aktuell nicht bestätigen, unterstützen sie die Annahme, dass Tiere ein Reservoir für Virulenzdeterminanten und -plasmide sein könnten.

#### **4.2. Genom-basierte Analysen von hypervirulenten *K. pneumoniae*-Isolaten (hvKp) aus Deutschland**

Weltweit nehmen die Berichte über Infektionen durch hvKp-Isolate zu, bisher liegen jedoch nur wenige Daten bezüglich der Prävalenz im europäischen Raum vor [62, 69, 118, 186]. Um einen Einblick über die Population von hvKp in Deutschland zu erhalten, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit 22 *K. pneumoniae*-Isolate aufgrund invasiver Infektionsverläufe und/oder eines hypermukoviskösen Phänotyps gesammelt und auf das Vorhandensein der Gene *rmpA* und *rmpA2* sowie der Serotypen K1 und K2 geprüft. Insgesamt konnte für diese 22 Isolate eine hohe Diversität

von 13 verschiedenen Sequenztypen nachgewiesen werden. Ganzgenom-basierte Analysen haben in der Literatur bisher gezeigt, dass der Sequenztyp ST23 die höchste Prävalenz unter *K. pneumoniae*-Isolaten aus Leberabszessen aufweist [118, 187, 188]. Diese Daten beziehen sich jedoch nur auf hvKp-Isolate aus dem asiatischen Raum.

Unter den identifizierten Sequenztypen von hvKp-Isolaten aus dieser Arbeit war der Sequenztyp ST23 mit acht Isolaten ebenfalls am häufigsten vertreten. Die in Europa gemeldeten hvKp-Infektionen werden oft mit Reisen in asiatische Länder assoziiert [69, 189]; dies könnte auch ein Grund für die relativ hohe Häufigkeit in dieser Stammsammlung sein. Da jedoch keine Patientendaten zu den Isolaten vorlagen, insbesondere keine Aussagen bezüglich ethnischer oder geographischer Herkunft, lässt sich dieser Zusammenhang hier nicht herstellen. Weitere in der Stammsammlung nachgewiesene Sequenztypen, wie ST5, ST66, ST307, ST380, ST412, ST893 und ST2398, wurden ebenfalls mit hvKp assoziiert, jedoch mit vergleichsweise niedriger Prävalenz [14, 61, 86, 88, 146, 190]. Über ST310-K1 Isolate wurde in der Literatur dagegen bisher wenig berichtet [7]. Nur im Rahmen einer Studie von nosokomialen *K. pneumoniae*-Infektionen in Australien wurde je ein respiratorisches und rektales ST310-K1-Isolat gesammelt [7]. Wie in dieser Arbeit besaßen die Isolate keine weiteren Virulenzfaktoren. Besonders interessant war der Nachweis eines ST66-Isolates, welches im Folgenden (siehe 4.3) gesondert diskutiert wird.

*K. pneumoniae* sind genetisch flexible Organismen und können bis zu 10 Plasmide gleichzeitig beherbergen [14, 191, 192]. So kam es in den vergangenen Jahren zu immer mehr Berichten über *K. pneumoniae*-Linien, die sowohl im Besitz von Resistenz- als auch Virulenzplasmiden sind [193, 194]. Auch in der verwendeten Stammsammlung wurden Vertreter weltweit dominanter ESBL- und Carbapenemase-produzierender Linien, wie ST17, ST147, ST307, ST392 sowie ST395, nachgewiesen. Besonders diese *K. pneumoniae*-Stämme können in Krankenhäuser eingetragen werden und sich unter Patienten ausbreiten. Auch wenn Carbapenemase-produzierende hvKP vor allem in China beobachtet wurden, kommt es auch in Mitteleuropa, einschließlich Deutschland, zu Krankenhausausbrüchen [175]. So berichteten zuletzt Heiden *et al.* über das Aufkommen eines Carbapenemase-bildenden und hypervirulenten *K. pneumoniae* ST307-Ausbruchsklons in vier norddeutschen Gesundheitseinrichtungen im Jahr 2018 [53, 54].

Bis zum heutigen Zeitpunkt werden die neun Kapseltypen K1, K2, K5, K10, K20, K25, K27, K54, und K57 mit Hypervirulenz in Verbindung gebracht. Weltweit gehört der überwiegende Teil hypervirulenter Isolate den Kapseltypen K1 und K2 an, non-K1/K2 Isolate haben eine vergleichsweise niedrigere Prävalenz [67, 83, 195], wie auch in dieser Arbeit beobachtet. Unter den 22 untersuchten hvKp-Isolaten aus Deutschland gehörten zehn Isolate den Serotypen K1 (n=5) und K2 (n=5) an. Während der Kapseltyp K1 stark mit dem Sequenztyp ST23 assoziiert ist, zeigen K2 und non-K1/K2-Isolate eine höhere Sequenztyp-Diversität [68]. Vier der in dieser Stammsammlung identifizierten K1-Isolate wurden dem Sequenztyp ST23 und eines dem Sequenztyp ST310 zugeordnet. Letzteres wurde aus einer Rindermastitis isoliert und zeigt, dass Isolate mit human-assoziierten, virulenten Kapseltypen auch bei Tieren Infektionen hervorrufen können. Die fünf K2-Isolate konnten den drei Sequenztypen ST66, ST380 und ST395 zugeordnet werden. Unter den non-K1/K2 Isolaten wurde vor allem der Kapseltyp K57 (n=5) nachgewiesen. Während in der Literatur K57 häufig mit dem Antibiotika-resistenten Sequenztyp ST412 assoziiert wird, wurde in dieser Arbeit nur ein ST412-K57-Isolat identifiziert, aber vier der seltener beschriebenen *single locus* Variante des CG23 Komplexes ST23-K57 zugeordnet [196, 197].

Hypervirulenz war zunächst auf wenige Kapseltypen beschränkt, weshalb es in den vergangenen Jahren Bestrebungen gab, die Kapselantigene für eine Impfstoffentwicklung gegen hvKp zu nutzen [198]. Dieses Vorhaben wird jedoch durch das Aufkommen multiresistenter *K. pneumoniae*-Linien, die über horizontalen Gentransfer Virulenzplasmide erworben haben und der damit einhergehenden Erweiterung des Kapselantigenspektrums, erschwert [199]. Diese Entwicklung konnte auch im Rahmen dieser Arbeit beobachtet werden. So wurden vier multiresistente Vertreter (ST17, ST147, ST307, ST392) der Kapseltypen K25, K27, K64 und K102 detektiert, die Virulenzplasmide trugen.

Anfänglich präsentierten hvKp-Stämme einen vollständig Antibiotika-sensiblen Phänotyp. Auch wenn es Berichte von multiresistenten hvKp vor allem aus China und vereinzelt aus dem europäischen Raum gibt, sollte dies in Deutschland aktuell noch ein seltenes Phänomen [193]. Zunächst erstaunlich bildete die Mehrheit der untersuchten hvKp-Isolate ESBL und/oder Carbapenemasen (n=18) und zeigten sich somit multiresistent. In der in dieser Arbeit untersuchten Sammlung zeigten nur vier der 22 Isolate den für hypervirulente Isolate beschriebenen Antibiotika-sensiblen

Genotyp. Eine Ursache für diese hohe Prävalenz von Multiresistenz ist in der fachlichen Ausrichtung der Arbeitsgruppe und den eingesandten Isolaten zu finden. In Zusammenarbeit mit dem Nationalen Referenzzentrum für Gram-negative Krankenhauserreger in Bochum untersucht die Arbeitsgruppe Multiresistente Gram-negative Erreger am RKI das Vorkommen und die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen. Es werden vorrangig *K. pneumoniae*-Isolate eingesandt, die durch Mehrfachresistenzen hervortreten, sodass durch die hohe Resistenzrate in der Stammsammlung ein verzerrtes Bild entsteht. Weiterhin erfolgt in Routinelaboratorien nur selten eine differenzierte Diagnostik über die Speziesidentifikation und die Resistenzbestimmung hinaus, wodurch sich vermuten lässt, dass ein großer Teil von Infektionen durch hypervirulente Isolate unentdeckt bleibt und der Anteil Antibiotika-sensibler hvKp-Isolate wahrscheinlich wesentlich höher ist als die verwendete Stammsammlung vermuten lässt. Dennoch zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass multiresistente hvKp bereits ein ernstzunehmendes Problem in Deutschland darstellen und wie von *Heiden et al.* beschrieben, den Weg in Gesundheitseinrichtungen gefunden haben und dort Ausbrüche verursachen können [54].

#### 4.3. Hypervirulente *K. pneumoniae* Linie ST66-K2

Aus *de novo* assemblierten Miseq-Sequenzdaten wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit für das hvKp-Isolat 18-0005 der Sequenztyp ST66 und der Kapseltyp K2 abgeleitet. Das erste vollständig sequenzierte (2014) und charakterisierte ST66-K2-Isolat war der *K. pneumoniae*-Stamm Kp52.145, welcher 1935 in Indonesien isoliert wurde [200]. Für Kp52.145 wurde ein 5,45 Mb großes Chromosom (ICEKp10, *ybt*, *clb*) sowie zwei Plasmide der Größe 95 kb (Plasmid I, *rmpA2*) und 121 kb (Plasmid II, *rmpA*, *iuc*, *iro*) beschrieben [157, 200]. Erst im Jahr 2010 wurde ein weiteres ST66-K2-Isolat in Australien gefunden [7]. Bereits kurz darauf, im Jahr 2014, wurde erstmals eine Infektion durch eine *K. pneumoniae* der Linie ST66-K2 in Europa (Frankreich) beschrieben [157]. Abweichend von den ersten zwei Isolaten, konnten *Rodrigues et al.* bei dem zuletzt genannten Isolat ein drittes etwa 3,7 kb großes Plasmid nachweisen. Darüber hinaus konnten sie zeigen, dass ein etwa 40 kb großes Fragment aus dem Plasmid I in das Plasmid II integriert wurde, welches eine Konjugationsmaschinerie kodiert. Anhand der Kombination von Miseq und MinION-Sequenzdaten des Isolates 18-0005 war es in der vorliegenden Arbeit möglich, die Sequenz von

ebenfalls drei Plasmiden der Größen 3,7 kb, 95 kb und 164 kb zu rekonstruieren. Es konnte die gleiche Insertion im Plasmid II beobachtet werden, welche für das Isolat aus Frankreich beschrieben wurde [157]. Darüber hinaus wurde ein weiteres Fragment (3 kb) aus dem Plasmid I im Plasmid II detektiert, welches für putative Transkriptionsregulatoren und mehrere uncharakterisierte Proteine kodiert. Diese Befunde deuten auf eine genetische Flexibilität des Virulenzplasmids hin, um z.B. neben der Möglichkeit eines konjugativen Transfers weitere Virulenz- oder Antibiotikaresistenz-Determinanten zu integrieren.

In dieser Arbeit wird durch das Isolat 18-0005 ein Fall präsentiert, in dem ein 33-jähriger männlicher Patient eine Tonsillopharyngitis aufweist, die durch einen ambulant erworbenen hvKp-Stamm verursacht wurde. Obwohl das Kardinalsymptom einer hvKp-Infektion ein pyogener Leberabszess ist, sind die klinische Bilder vielfältig; so wurde eine Pharyngitis bereits früher beschrieben [67]. Diabetes, Alkoholismus und HIV sind Wirts-Risikofaktoren, die mit hvKp-Infektionen in Verbindung gebracht werden [67]. Die Anamnese des Patienten zeigte jedoch keine zugrundeliegenden Primärerkrankungen. Das Isolat 18-0005 war vollständig empfindlich gegenüber allen getesteten Antibiotika, was mit früheren Studien zu hvKp übereinstimmt [69]. Nach Behandlung mit einer Octenidin-haltigen Mund- und Rachenspülung blieb der Patient klinisch asymptomatisch ohne den Nachweis einer disseminierten Infektion. Dies legt nahe, dass eine frühzeitige Erkennung und Behandlung von hvKp-Infektionen wichtig ist, um einen invasiven Verlauf zu verhindern.

Das analysierte Isolat 18-0005 wies zudem einen hypermukoviskösen Phänotyp auf, der eines der definierenden Merkmale von hvKp-Stämmen darstellt. Obwohl die direkte Assoziation von Hypervirulenz mit Hypermukoviskosität umstritten ist, zeigt dieser Fall, dass ein positiver String-Test ein starker Indikator für das Vorhandensein eines hvKp-Stammes ist.

Die Ganzgenom-Analysen von klinischen *K. pneumoniae*-Isolaten bestätigen das Vorhandensein weltweit verbreiteter, hypervirulenter *K. pneumoniae*-Linien in Deutschland. Die Häufigkeit von Antibiotikaresistenzen unterliegt aufgrund der Stammsammlung multiresistenter *K. pneumoniae* des RKI einem Bias. Die in dieser Studie gewonnenen Erkenntnisse unterstreichen die Dringlichkeit, die Aufmerksamkeit für hypervirulente *K. pneumoniae* zu steigern, einheitliche Verfahren



zur Virulenzprädiktion einzuführen und valide Marker für die Labordiagnostik abzuleiten. Auf diese Weise kann eine frühzeitige Erkennung und Behandlung gelingen, um eine hohe Morbidität und Mortalität zu verhindern.

#### **4.4. Funktionelle Analysen von *K. pneumoniae* zur Erfassung einer möglichen Wirtsassoziation, Wirtsadaption und Auswirkungen auf die Virulenz und Antibiotikaresistenz**

Bisherige Studien konzentrierten sich auf genomweite Assoziationsstudien weltweit verbreiteter *K. pneumoniae*-Linien („*High risk clones*“) sowie epidemiologische Studien zur Erkennung von Risikofaktoren, die eine nosokomiale *K. pneumoniae* Infektion begünstigen [6, 201-203]. Doch angesichts steigender Antibiotikaresistenzen und der weltweiten Verbreitung hypervirulenter Stämme, ist ein besseres Verständnis der Pathogenese von *K. pneumoniae* für die Entwicklung von Präventivmaßnahmen und gezieltere Behandlungen unerlässlich. Daher sollten im Rahmen dieser Arbeit mögliche Wirtsassoziationen von unterschiedlichen *K. pneumoniae*-Pathotypen untersucht werden, um Aussagen über Wirtsadaptionen treffen zu können, die zu der erfolgreichen Verbreitung dieses Bakteriums beitragen.

Vor dem Hintergrund der obigen Fragestellung wurden mittels lichtmikroskopischer Aufnahmen Unterschiede in der Zellmorphologie von hvKp-Isolaten im Vergleich zu cKp- und ESBL-cKp-Isolaten untersucht und belegt. Die analysierten hvKp-Isolate zeigten als einzige einen filamentösen Phänotyp. Diese visuelle Beobachtung wurde durch Messungen der Zelllängen quantifiziert; eine durchschnittlich größere Zelllänge von hvKp-Isolaten gegenüber cKp- und ESBL-cKp-Isolaten wurde bestätigt. In der Literatur wird die Filamentierung von Bakterienzellen oft als Resultat einer gestörten Zellteilung beschrieben [204, 205]. Doch einige Bakterien sind in der Lage durch eine vorübergehende zellmorphologische Veränderung auf Stressbedingungen wie oxidativen Stress, Nährstoffmangel oder die Abwehrmechanismen durch das Wirtsimmunsystem zu reagieren [206]. So wurde für *E. coli* beobachtet, dass die mit einem filamentösen Phänotyp einhergehende Vergrößerung der Zelloberfläche die Anhaftung an Oberflächen positiv beeinflusst und die Bakterien vor der Phagozytose durch Immunzellen schützt [205]. Es ist daher davon auszugehen, dass auch bei *K. pneumoniae* die Zellfilamentierung von hvKp neben der Kapsel einen

Schutzmechanismus vor der Immunabwehr des Wirtsorganismus darstellt. Unter Hypoxie wurde ebenfalls eine Zunahme der Zelllänge für cKp- und ESBL-cKp-Isolate beobachtet, jedoch in einem deutlich geringeren Ausmaß als bei den hvKp-Isolaten. Da filamentöse Bakterien einen Vorteil in der Adhärenz an Epithelzellen besitzen und im Darm Hypoxie-Bedingungen vorherrschen, könnte ein verringerter Sauerstoffgehalt ein Umweltsignal für *K. pneumoniae* zur Veränderung der Zellmorphologie sein, um besser an das Darmepithel zu adhären.

Im Zellkulturmodell wurde daraufhin untersucht, ob die Pathotypen Unterschiede in der Wirt-Pathogen-Interaktion aufweisen. Da vor allem eine respiratorische bzw. eine gastrointestinale Besiedlung des Bakteriums als Reservoir für *K. pneumoniae*-Infektionen betrachtet werden, wurden die Zellinfektionsexperimente mit der Lungenzelllinie A549 sowie den Darmzelllinien HT29-MTX und HuTu80 durchgeführt [207]. In vorangegangenen Zellinfektionsexperimenten wurden die Adhäsion und die zelluläre Invasion von bekapselten und unbekapselten *K. pneumoniae*-Isolaten verglichen [46, 208-210]. So wird ein direkter Zusammenhang einer effizienten Adhäsion an und Invasion in Lungenepithelzellen mit der Fähigkeit zur CPS-Expression von *K. pneumoniae*-Isolaten beschrieben [208, 209, 211, 212]. Im Rahmen dieser Arbeit wurden deshalb Vertreter der drei *K. pneumoniae*-Pathotypen cKp, ESBL-cKp und hvKp verglichen. Dabei wurden jedoch keine Unterschiede in der Adhärenz an und Invasion in A549-Lungenzellen festgestellt. Im Allgemeinen waren die Adhäsions-/Invasionsraten, die in dieser Arbeit beobachtet wurden, bei der Lungenzelllinie niedriger als bei den Darmzellen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Adhäsion und Invasion bei Lungenzellen keinen klassischen Pathomechanismus von *K. pneumoniae* darstellen. Ein möglicher Weg, wie das Bakterium die Zellbarriere im Respirationstrakt zu überwinden vermag, ist über die Störung der Zellintegrität des Epithels zum einen durch Verletzungen im Respirationstrakt oder, wie von *Cano et al.* beschrieben, über einen cytotoxischen Effekt auf A549-Lungenzellen durch bekapselte *K. pneumoniae*-Isolate [125].

Im Darmzellmodell wurden hingegen Unterschiede in der Adhärenz und Invasion zwischen den *K. pneumoniae*-Pathotypen festgestellt. Während die cKp- und ESBL-Isolate gleichermaßen zur Adhäsion an Darmzellen befähigt sind, wurde keine Adhäsion der untersuchten hvKp-Isolate beobachtet. Diese Ergebnisse sind kongruent mit den Beobachtungen, dass eine dicke Kapselschicht die Adhäsionsfähigkeit von *K. pneumoniae* verringert [208]. Darüberhinaus wurde

die Hypothese widerlegt, dass eine vergrößerte Zelloberfläche durch einen filamentösen Phänotyp die Adhäsion steigert.

*Hus et al.* konnten im Zellkulturmodell zeigen, dass *K. pneumoniae* über einen transzellulären Weg die Barrierefunktion des Darmepithels überwinden können [131]. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit nur für ESBL-cKp bestätigt werden. Die untersuchten cKp- und hvKp-Isolate zeigten *in vitro* keine zelluläre Invasion in der verwendeten Darmzelllinie. Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit den Beobachtungen von *Sahly et al.*; dort wurde eine gesteigerte zelluläre Invasion von ESBL-produzierenden *K. pneumoniae*-Isolaten beschrieben [141]. Daraufhin wurde der nicht-invasive *E. coli* K12 J53 und dessen Derivate, in denen über Konjugation ESBL-Gen-tragende Plasmide aus parental *K. pneumoniae*-Isolaten überführt wurden, in Zellinvasionsexperimenten verglichen. Auch hier zeigen die Daten einen Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von ESBL-Plasmiden und einer gesteigerten Invasionsfähigkeit. Es ist wahrscheinlich, dass *in vivo* zusätzliche Stressoren an der Regulation für eine erfolgreiche Wirts-Pathogen- Interaktion beteiligt sind, die in *in vitro* Zellexperimenten keine Berücksichtigung finden können. Dennoch lassen die erhobenen Daten darauf schließen, dass die Plasmide neben ESBL-Genen für Faktoren kodieren, die die zelluläre Invasion begünstigen und somit eine wesentliche Rolle in der Pathogenese von *K. pneumoniae* zu spielen scheinen. Außerdem ist zu vermuten, dass der Erwerb von Multiresistenzen die Pathogenese von hvKp ebenfalls beeinflusst. Noch liegen keine Erkenntnisse vor, wie stabil die Resistenzgen-tragenden Plasmide in den hvKp Stämmen sind und welche Fitnesslast damit einhergeht [213]. Ungeachtet dessen bergen multiresistente hvKp das Potential die Population nosokomial assoziierter *K. pneumoniae*-Stämme drastisch zu verändern.

Zu den Krankheitsbildern einer hvKp Infektionen zählen invasive und nekrotisierende Infektionen, was einen cytoxischen Effekt von hvKp-Isolaten vermuten lässt [214]. Im Rahmen dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die untersuchten hypervirulenten Isolate einen signifikant höheren cytotoxischen Effekt auf Darmepithelzellen aufweisen als cKp- oder ESBL-cKp-Isolate. In mikroskopischen Aufnahmen der Darmzellinfektionen wurden Löcher im Monolayer beobachtet, die den Verlust der epithelialen Integrität belegen. Es ist daher davon auszugehen, dass der Anteil non-viabler Zellen noch höher gewesen ist, da die abgelösten und im Folgenden weggespülten Zellen nicht detektiert werden konnten. Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf hin, dass hvKp

nicht in Darmzellen invadieren, sondern - durch ihre cytotoxische Wirkung - das Darmepithel schädigen und auf diesen Weg die Darmbarriere überwinden. Insbesondere neuere Arbeiten beschreiben Virulenzfaktoren, die diese Hypothese unterstützen. So wurde für Colibactin-produzierende *K. pneumoniae*-Isolate *in vitro* eine genotoxische Wirkung auf eukaryotische Zellen beobachtet [99, 116]. Es wird davon ausgegangen, dass Colibactin zur Apoptose von Darmzellen führt und so die intestinale Translokation von hvKp ermöglicht [14, 215].

Die Kapsel von *K. pneumoniae* ist der wichtigste Virulenzfaktor [46, 216]. Sie schützt die Bakterien vor Antibiotika, dem Komplementsystem der Immunabwehr und der Phagozytose [217]. Aus der Literatur ist bekannt, dass bekapselte *K. pneumoniae in vivo* resistent gegenüber der Opsonierung und damit auch gegenüber der Aufnahme durch Phagozyten sind [218, 219]. In diesen Studien wurden auch bekapselte *K. pneumoniae*-Isolate und Kapselmutanten untereinander verglichen. Es wurde jedoch nur allgemein die Rolle der Kapsel auf die Wirtsinteraktion untersucht. Aus der Literatur lassen sich somit noch keine Rückschlüsse auf Unterschiede zwischen den *K. pneumoniae*-Pathotypen ziehen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde daher untersucht, inwieweit sich die Fähigkeiten der Phagozytoseresistenz, der intrazellulären Persistenz sowie der Replikation zwischen den verschiedenen *K. pneumoniae*-Pathotypen unterscheiden. Anhand des verwendeten Infektionsmodells mit RAW 264.7-Mausmakrophagen konnten signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen *K. pneumoniae*-Pathotypen beobachtet werden. Sowohl cKp- als auch ESBL-cKp wurden gleichermaßen von den Immunzellen phagozytiert, während die hvKp-Isolate nicht phagozytiert wurden.

Weiterhin zeigten die Ergebnisse auch keine intrazelluläre Persistenz oder Replikation für hvKp-Isolate. Hierfür kommen mehrere Gründe in Betracht. Zum einem ist eine vermehrte Kapselsynthese für hvKp-Isolate charakteristisch, wodurch sie für Makrophagen schlechter zugänglich sind. Des Weiteren konnte, wie zuvor beschrieben, eine Filamentierung der hvKp Bakterienzellen beobachtet werden. Für einige Bakterien ist bekannt, dass sie von der bazillären zur filamentösen Zellform wechseln und somit schlechter zugänglich für phagozytotische Zellen sind [220]. Einschränkung ist jedoch die insgesamt vergleichsweise geringe Anzahl phagozytierter hvKp zu betrachten, die trotz einer großen Anzahl von Replikaten zu einer höheren Standardabweichung in den Zählergebnissen führten.

Ferner konnte die von *Cano et al.* beschriebene Fähigkeit zur gesteigerten intrazellulären Persistenz von ESBL-cKp gegenüber cKp in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden [221]. Interessanterweise waren die untersuchten ESBL-Isolate ebenfalls in der Lage, sich *in vitro* in RAW-Mausmakrophagen zu replizieren. Während sich hvKp dem Zugriff durch Makrophagen entziehen konnten, haben ESBL-cKp eine Strategie gefunden, sich ähnlich wie klassische intrazelluläre Pathogene wie *Legionella pneumophila* und *Salmonella enterica* in Makrophagen zu vermehren [222]. Dabei scheint intrazelluläre Persistenz von *K. pneumoniae* in Makrophagen keine wirtsspezifische Komponente zu sein, da sich human- und veterinärpathogene *K. pneumoniae*-Stämme in dieser Arbeit ähnlich verhielten.

Derzeit werden unterschiedliche Strategien verfolgt um das Virulenzpotential von *K. pneumoniae* vorauszusagen: (I) ausgehend vom klinischen Bild weniger Isolate, (II) aus NGS- und GWAS-Daten vieler Isolate sowie (III) aus funktionellen Analysen mit Isolaten definierter Infektionen. So haben *Russo et al.* beschrieben, dass nicht allein die Anwesenheit von Siderophoren, sondern deren Expressionslevel mit der Virulenz korreliert [62, 76, 223]. Dies steht im Gegensatz zum Ansatz der Virulenzprädiktion von *Holt et al.*, bei der genomische Siderophorgene aufsummiert und anhand dessen ein Virulenz-Score vergeben wird, ohne das Expressionslevel zu berücksichtigen [7, 11, 185].

Das Paul-Ehrlich-Institut verfügt über eine Sammlung an Referenzstämmen zur Validierung von Nachweismethoden bakterieller Verunreinigungen von Blutprodukten [145, 224]. Dazu zählt das aus einem kontaminierten Thrombozytenkonzentrat isolierte ST48-K62-Isolat PEI-B-P-08. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Wachstum von hvKp-Isolaten, welche unterschiedliche Siderophorsysteme besitzen (Tabelle A 4), mit dem dieses Referenzstammes in Thrombozytenkonzentraten verglichen. Das Referenz-Isolat, welches nur Yersiniabactin besitzt und der hypervirulente Referenzstamm NCTC14052 gehörten dabei zu den schnell wachsenden Isolaten. Die Isolate 18-0030 (ST310-K1) und 17-0609 (ST3895-K2) waren ebenfalls in der Lage sich in Thrombozytenkonzentraten zu vermehren, jedoch war deren Proliferation zeitlich verzögert. Interessanterweise wurde für das Isolat 19-0213 (ST23-K57) und ATCC700721 (ST38-K15) erst nach einer Inkubationsdauer von 37 Stunden eine Vermehrung detektiert. Bakterien die solch eine lange lag-Phase aufweisen, stellen eine große Herausforderung in der

Transfusionsmedizin dar, da eine derartige bakterielle Kontamination nur schwierig zu detektieren ist und die Gefahr transfusionsbedingter bakterieller Infektionen birgt. Für vier der untersuchten Isolate konnte trotz des Vorhandenseins von Siderophoren kein Wachstum beobachtet werden.

Die gewonnenen Daten deuten im Gegensatz zu der Literaturtheorie [7, 62], die sich vorwiegend auf Genomstudien stützt, jedoch keine experimentellen Befunde zugrunde legt, darauf hin, dass Siderophore *keine* essentiellen Faktoren für die Proliferation von *K. pneumoniae* in Blutkomponenten darstellen. So wurde in Kooperation mit dem Paul-Ehrlich-Institut gezeigt, dass die Virulenzprädiktion alleine durch das Vorhandensein oder die Abwesenheit von Siderophoren nicht notwendigerweise mit dem Vermehrungsvermögen in Blutkomponenten assoziiert ist, was die Verlässlichkeit der vorgeschlagenen Klassifizierung von hvKp Isolaten anhand des bloßen Vorhandenseins bestimmter Eisentransportsysteme in Frage stellt [7, 154]. Stattdessen geben die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit (3.4.4 und 3.4.5) Hinweise darauf, dass die Kapsel die entscheidende Rolle in der Pathogenese von *K. pneumoniae* spielt. Daher rückt in aktuellen Studien auch immer mehr die Untersuchung der Kapsel von *K. pneumoniae* und deren Synthesemechanismen in den Fokus. Besonders für hvKp-Isolate werden immer mehr genetische Faktoren beschrieben, die zu einer attenuierten Kapselsynthese im Vergleich zu anderen Pathotypen führen und einen Überlebensvorteil im Wirtsorganismus bieten [100]. Hierbei wird insbesondere die Anwesenheit der Transkriptionsregulatoren RmpA und RmpA2 mit einem hypermukoviskösen Phänotyp und einer gesteigerten Virulenz assoziiert [86, 104, 142, 143, 225]. Bereits im Vorfeld dieser Arbeit wurde in Studien eine reduzierte Kapselsynthese, verursacht durch Mutationen in *rmpA/A2*, beobachtet [225]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen nun, dass RmpA zusätzlich einen Einfluss auf die Zellmorphologie von *K. pneumoniae* hat. Die Deletion dieses *rmpA*-Gens führte zu einer Reduktion der Zelllänge und zu einer Zunahme zellulärer Invasion des untersuchten hvKp-Isolates 17-0736 (ST5-K39). Das Isolat besaß neben dem für *K. pneumoniae* typischen *bla*<sub>SHV-11</sub>-Gen keine weiteren Resistenzdeterminanten, weshalb die Invasionsrate einem cKp-Isolat entsprach und die Zunahme der Invasion nicht signifikant war. In Übereinstimmung mit diesem Befund führte die Transformation eines *rmpA* kodierenden Vektors in ein cKp-Isolat zu einer deutlichen Zelllängenzunahme. Interessanterweise war der filamentöse Phänotyp des 17-0736 Wildtyps im Vergleich zu den zuvor beschriebenen Isolaten 17-

0609 (ST2398-K2) und 18-0005 (ST66-K2) weniger stark ausgeprägt. Dies lässt sich durch die Annahme erklären, dass sich die Expressionsstärke von chromosomalen und episomalen *rmpA* unterscheidet. So wurde durch Lin *et al.* beschrieben, dass eine Überexpression von *rmpA* die Virulenz von *K. pneumoniae* in Mausinfektionsexperimenten erhöht [143]. Auch durch die episomale Komplementation der *rmpA*-Deletion wurde keine übermäßige Filamentierung herbeigeführt. Eine mögliche Ursache für diese Beobachtung könnte darin liegen, dass das Isolat einen weiteren Regulator oder eine Mutation in einem durch *rmpA* regulierten Gen trägt. Das *rmpA*-Gen unterliegt ebenfalls der Regulation durch Transkriptionsaktivatoren. So wird die *cps*-Genclusteraktivierung von RmpA und RmpA2 durch einen Fumarat-Nitrat-Reduktions-Regulator (FNR) in Abhängigkeit von Sauerstoff beeinflusst [226]. Des Weiteren reguliert der Eisenaufnahme-Regulator Fur die Expression von *rmpA* in Abhängigkeit von der Eisenverfügbarkeit [227].

Zusammenfassend zeigen die Daten aus den *in vitro* Infektionsexperimenten, dass sich die Pathotypen cKp, ESBL-cKp und hvKp in der Wirts-Pathogen-Interaktion hinsichtlich ihrer Invasion und der Resistenz gegenüber Phagozytose durch Makrophagen unterscheiden. Der Erwerb von Resistenzplasmiden scheint mit einer gesteigerten Invasion und dem Überleben im Wirt einherzugehen. So wurden Hinweise dafür gefunden, dass die erfolgreiche Verbreitung resisistenter *K. pneumoniae*-Linien nicht alleine durch einen Überlebensvorteil unter selektiven Druck durch Antibiotika begründet ist, was zu einem besseren Verständnis pathogener Mechanismen von *K. pneumoniae* beiträgt. Für hvKp wurde ein stärkerer cytotoxischer Effekt auf Darmzellen beobachtet, der vermutlich deren intestinale Translokation begünstigt. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass das bloße Vorhandensein von Siderophor-kodierenden Genen keinen entscheidenden Einfluss auf die Proliferation von hvKp in Blut haben. Vielmehr scheint die Kapsel-vermittelte Serumresistenz die entscheidendere Rolle zu spielen. Die Untersuchungen des Kapselsyntheseregulators RmpA hat gezeigt, dass dieser ebenfalls einen Einfluss auf die Zellmorphologie von *K. pneumoniae* hat, was vermuten lässt, dass die an der Kapselsynthese beteiligten Faktoren ein komplexes regulatorisches Netzwerk bilden.

## 5. Ausblick

Die hier durchgeführten Genomanalysen von *K. pneumoniae*-Isolaten tierischen Ursprungs haben gezeigt, dass Schweine ein Reservoir für *K. pneumoniae* sein können, welche die Aerobactin-kodierenden Gene der Linie *iuc3* tragen. Auch wenn die Ergebnisse in dieser Arbeit bereits deutliche Hinweise darauf liefern, bedarf es weiterer experimenteller Belege unter Verwendung einer größeren Anzahl an *K. pneumoniae*-Isolaten von Schweinen, um diese Hypothese zu bestätigen.

Die Genom-basierten Analysen von hypervirulenten *K. pneumoniae*-Isolaten, die in der vorliegenden Arbeit präsentiert wurden, wurden auf der Grundlage einer Stammsammlung durchgeführt, die vorrangig klinische Isolate umfasste, die bereits durch ihre Resistenz gegenüber Antibiotika aufgefallen waren. Die sich aus dieser externen Vorauswahl ergebenden Nachteile wurden zuvor im Kapitel 4.2 diskutiert und schränken die Generalisierung der vorgelegten Ergebnisse daher ein. Demzufolge sollte die Stammsammlung so erweitert werden, dass auch ambulant erworbene Isolate einbezogen werden um so Aussagen bezüglich der Prävalenz Antibiotika-sensibler und multiresistenter hvKp-Isolate in Deutschland treffen zu können; Auch wenn dies in Anbetracht der derzeitigen Diskussion zu den Hypervirulenzmerkmalen herausfordernd erscheint.

In der vorliegenden Studie konnte bereits gezeigt werden, dass der Erwerb eines Resistenzplasmids mit einer gesteigerten zellulären Invasion und intrazellulären Replikation von *K. pneumoniae* verbunden ist. Da Resistenzplasmide von *K. pneumoniae* unterschiedlichen Inkompatibilitätsgruppen angehören und eine große genetische Diversität aufweisen, können bisher keine Aussagen darüber getroffen werden, ob dies auf alle Resistenzplasmide zutrifft oder welche Faktoren genau die beschriebenen Effekte bedingen. Um diesen Sachverhalt näher zu untersuchen, könnte eine Plasmid-Bibliothek, durch die Konjugation einzelner Resistenzplasmide mit unterschiedlichen Eigenschaften (Inkompatibilitätsgruppen, Resistenzgene) in *E. coli* K12 J53 oder noch besser in einem geeigneten *K. pneumoniae* Rezipientenstamm erstellt und die Invasionsfähigkeit im Zellkulturmodell untersucht werden. Mittels vergleichender Sequenzanalysen könnten auf diese Weise Gene identifiziert werden, die alle Plasmide gemein haben und die die Invasion beeinflussen.



In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass *rpmA* an der Regulierung der Zelllänge beteiligt ist. Um diesen Befund weiter zu untermauern, könnte in vergleichenden Transkriptom-Studien mittels RNA-Sequenzierung die Gesamtheit aller durch den Transkriptionsregulator regulierten Gene in *K. pneumoniae* ermittelt werden. Als Beleg sollten die durch RNA-Sequenzierung identifizierten Gene anschließend deletiert werden. In *in vitro* Infektionsexperimenten könnten diese Deletionsmutanten ein besseres Verständnis über die gegenseitige Beeinflussung der Faktoren und die Regulation der Kapselsynthese fördern und die Entwicklung neuer Therapeutika gegen hvKp ermöglichen.

Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, kann sich *K. pneumoniae* vor der Abtötung durch das Blutserum schützen; Siderophore sind dagegen für das Überleben in Blutkomponenten nicht essentiell. Ein Ansatzpunkt für weitere Studien sollte daher sein, mittels Transposon-Mutagenese und Transposon-Sequenzierung Gene zu identifizieren, die die Serumresistenz vermitteln.

## 6. Literatur

1. Dworkin, M., *Etymologia: Klebsiella*. Emerging infectious diseases, 2010. **16**: p. 1418.
2. Podschun, R. and U. Ullmann, *Klebsiella spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors*. Clinical Microbiology Reviews, 1998. **11**(4): p. 589-+.
3. Murphy, C.N. and S. Clegg, *Klebsiella pneumoniae and type 3 fimbriae: nosocomial infection, regulation and biofilm formation*. Future Microbiology, 2012. **7**(8): p. 991-1002.
4. Maroncle, N., et al., *Identification of Klebsiella pneumoniae genes involved in intestinal colonization and adhesion using signature-tagged mutagenesis*. Infection and Immunity, 2002. **70**(8): p. 4729-4734.
5. Bagley, S.T., *Habitat Association of Klebsiella Species*. Infection Control and Hospital Epidemiology, 1985. **6**(2): p. 52-58.
6. Martin, R.M. and M.A. Bachman, *Colonization, Infection, and the Accessory Genome of Klebsiella pneumoniae*. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2018. **8**.
7. Holt, K.E., et al., *Genomic analysis of diversity, population structure, virulence, and antimicrobial resistance in Klebsiella pneumoniae, an urgent threat to public health*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2015. **112**(27): p. E3574-E3581.
8. Oliveira, P.H., et al., *The chromosomal organization of horizontal gene transfer in bacteria*. Nature Communications, 2017. **8**.
9. Bi, D., et al., *Mapping the resistance-associated mobilome of a carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae strain reveals insights into factors shaping these regions and facilitates generation of a 'resistance-disarmed' model organism*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2015. **70**(10): p. 2770-2774.
10. Frost, L.S., et al., *Mobile genetic elements: the agents of open source evolution*. Nature Reviews Microbiology, 2005. **3**(9): p. 722-732.
11. Lam, M.M.C., et al., *Genetic diversity, mobilisation and spread of the yersiniabactin-encoding mobile element ICEKp in Klebsiella pneumoniae populations*. Microbial Genomics, 2018. **4**(9).
12. Lepuschitz, S., et al., *Fecal Klebsiella pneumoniae Carriage Is Intermittent and of High Clonal Diversity*. Front Microbiol, 2020. **11**: p. 581081.
13. Yang, Y., et al., *Genomic Diversity, Virulence, and Antimicrobial Resistance of Klebsiella pneumoniae Strains from Cows and Humans*. Appl Environ Microbiol, 2019. **85**(6).
14. Wyres, K.L., M.M.C. Lam, and K.E. Holt, *Population genomics of Klebsiella pneumoniae*. Nature Reviews Microbiology, 2020. **18**(6): p. 344-359.

15. Brisse, S., S. Issenhuth-Jeanjean, and P.A. Grimont, *Molecular serotyping of Klebsiella species isolates by restriction of the amplified capsular antigen gene cluster*. J Clin Microbiol, 2004. **42**(8): p. 3388-98.
16. Follador, R., et al., *The diversity of Klebsiella pneumoniae surface polysaccharides*. Microbial Genomics, 2016. **2**(8).
17. Rahn, A., J. Drummelsmith, and C. Whitfield, *Conserved organization in the cps gene clusters for expression of Escherichia coli group 1 K antigens: Relationship to the colanic acid biosynthesis locus and the cps genes from Klebsiella pneumoniae*. Journal of Bacteriology, 1999. **181**(7): p. 2307-2313.
18. Shu, H.Y., et al., *Genetic diversity of capsular polysaccharide biosynthesis in Klebsiella pneumoniae clinical isolates*. Microbiology-Sgm, 2009. **155**: p. 4170-4183.
19. Whitfield, C., *Biosynthesis and assembly of capsular polysaccharides in Escherichia coli*. Annual Review of Biochemistry, 2006. **75**: p. 39-68.
20. Pan, Y.J., et al., *Genetic analysis of capsular polysaccharide synthesis gene clusters in 79 capsular types of Klebsiella spp.* Scientific Reports, 2015. **5**.
21. Arakawa, Y., et al., *Genomic Organization of the Klebsiella-Pneumoniae Cps Region Responsible for Serotype K2 Capsular Polysaccharide Synthesis in the Virulent-Strain Chedid*. Journal of Bacteriology, 1995. **177**(7): p. 1788-1796.
22. Yu, W.L., et al., *Intrapersonal mutation of rmpA and rmpA2: A reason for negative hypermucoviscosity phenotype and low virulence of rmpA-positive Klebsiella pneumoniae isolates*. J Glob Antimicrob Resist, 2015. **3**(2): p. 137-141.
23. Brisse, S., et al., *wzi Gene Sequencing, a Rapid Method for Determination of Capsular Type for Klebsiella Strains*. Journal of Clinical Microbiology, 2013. **51**(12): p. 4073-4078.
24. Hasani, A., et al., *Serotyping of Klebsiella pneumoniae and Its Relation with Capsule-Associated Virulence Genes, Antimicrobial Resistance Pattern, and Clinical Infections: A Descriptive Study in Medical Practice*. Infection and Drug Resistance, 2020. **13**: p. 1971-1980.
25. Wick, R.R., et al., *Kaptive Web: User-Friendly Capsule and Lipopolysaccharide Serotype Prediction for Klebsiella Genomes*. Journal of Clinical Microbiology, 2018. **56**(6).
26. Wyres, K.L., et al., *Identification of Klebsiella capsule synthesis loci from whole genome data*. Microbial Genomics, 2016. **2**(12).
27. Maiden, M.C.J., et al., *Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998. **95**(6): p. 3140-3145.
28. Diancourt, L., et al., *Multilocus sequence typing of Klebsiella pneumoniae nosocomial isolates*. Journal of Clinical Microbiology, 2005. **43**(8): p. 4178-4182.

29. Gona, F., et al., *Comparison of core-genome MLST, coreSNP and PFGE methods for Klebsiella pneumoniae cluster analysis*. Microbial Genomics, 2020. **6**(4).
30. Dekker, J.P. and K.M. Frank, *Next-Generation Epidemiology: Using Real-Time Core Genome Multilocus Sequence Typing To Support Infection Control Policy*. Journal of Clinical Microbiology, 2016. **54**(12): p. 2850-2853.
31. Livermore, D.M., *beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance*. Clin Microbiol Rev, 1995. **8**(4): p. 557-84.
32. Wand, M.E., et al., *Characterization of pre-antibiotic era Klebsiella pneumoniae isolates with respect to antibiotic/disinfectant susceptibility and virulence in Galleria mellonella*. Antimicrob Agents Chemother, 2015. **59**(7): p. 3966-72.
33. Paterson, D.L. and R.A. Bonomo, *Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update*. Clin Microbiol Rev, 2005. **18**(4): p. 657-86.
34. Livermore, D.M. and N. Woodford, *The beta-lactamase threat in Enterobacteriaceae, Pseudomonas and Acinetobacter*. Trends Microbiol, 2006. **14**(9): p. 413-20.
35. Bush, K., G.A. Jacoby, and A.A. Medeiros, *A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure*. Antimicrob Agents Chemother, 1995. **39**(6): p. 1211-33.
36. Navon-Venezia, S., K. Kondratyeva, and A. Carattoli, *Klebsiella pneumoniae: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance*. FEMS Microbiol Rev, 2017. **41**(3): p. 252-275.
37. Rozwandowicz, M., et al., *Plasmids carrying antimicrobial resistance genes in Enterobacteriaceae*. J Antimicrob Chemother, 2018. **73**(5): p. 1121-1137.
38. Rayamajhi, N., et al., *Inter- and intraspecies plasmid-mediated transfer of florfenicol resistance in Enterobacteriaceae isolates from swine*. Appl Environ Microbiol, 2009. **75**(17): p. 5700-3.
39. Jacoby, G.A. and A.A. Medeiros, *More extended-spectrum beta-lactamases*. Antimicrob Agents Chemother, 1991. **35**(9): p. 1697-704.
40. Labia, R., et al., *The kinetics of SHV-2 plasmid-mediated beta-lactamase compared to those of the parent enzyme from which it is derived*. Drugs Exp Clin Res, 1988. **14**(5): p. 335-9.
41. Paterson, D.L., *Recommendation for treatment of severe infections caused by Enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs)*. Clin Microbiol Infect, 2000. **6**(9): p. 460-3.
42. Perrott, J., V.H. Mabasa, and M.H. Ensom, *Comparing outcomes of meropenem administration strategies based on pharmacokinetic and pharmacodynamic principles: a qualitative systematic review*. Ann Pharmacother, 2010. **44**(3): p. 557-64.
43. Filgona, J., T. Banerjee, and S. Anupurba, *Role of efflux pumps inhibitor in decreasing antibiotic resistance of Klebsiella pneumoniae in a tertiary hospital in North India*. J Infect Dev Ctries, 2015. **9**(8): p. 815-20.

44. Kaczmarek, F.M., et al., *High-level carbapenem resistance in a Klebsiella pneumoniae clinical isolate is due to the combination of bla(CTX-M-1) beta-lactamase production, porin OmpK35/36 insertional inactivation, and down-regulation of the phosphate transport porin phoE*. Antimicrob Agents Chemother, 2006. **50**(10): p. 3396-406.
45. Martinez-Martinez, L., *Extended-spectrum beta-lactamases and the permeability barrier*. Clin Microbiol Infect, 2008. **14 Suppl 1**: p. 82-9.
46. Opoku-Temeng, C., S.D. Kobayashi, and F.R. DeLeo, *Klebsiella pneumoniae capsule polysaccharide as a target for therapeutics and vaccines*. Comput Struct Biotechnol J, 2019. **17**: p. 1360-1366.
47. Control, E.C.f.D.P.a., *Antimicrobial resistance in the EU/EEA (EARS-Net) -Annual Epidemiological Report 2019*. 2019.
48. Koppe, U., et al., *Carbapenem non-susceptibility of Klebsiella pneumoniae isolates in hospitals from 2011 to 2016, data from the German Antimicrobial Resistance Surveillance (ARS)*. Antimicrob Resist Infect Control, 2018. **7**: p. 71.
49. Wyres, K.L. and K.E. Holt, *Klebsiella pneumoniae as a key trafficker of drug resistance genes from environmental to clinically important bacteria*. Curr Opin Microbiol, 2018. **45**: p. 131-139.
50. Lee, G.C. and D.S. Burgess, *Treatment of Klebsiella pneumoniae carbapenemase (KPC) infections: a review of published case series and case reports*. Ann Clin Microbiol Antimicrob, 2012. **11**: p. 32.
51. Ordooei Javan, A., S. Shokouhi, and Z. Sahraei, *A review on colistin nephrotoxicity*. Eur J Clin Pharmacol, 2015. **71**(7): p. 801-10.
52. Chen, L., et al., *Notes from the Field: Pan-Resistant New Delhi Metallo-Beta-Lactamase-Producing Klebsiella pneumoniae - Washoe County, Nevada, 2016*. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 2017. **66**(1): p. 33.
53. Haller, S., et al., *Extensively drug-resistant Klebsiella pneumoniae ST307 outbreak, north-eastern Germany, June to October 2019*. Euro Surveill, 2019. **24**(50).
54. Heiden, S.E., et al., *A Klebsiella pneumoniae ST307 outbreak clone from Germany demonstrates features of extensive drug resistance, hypermucoviscosity, and enhanced iron acquisition*. Genome Med, 2020. **12**(1): p. 113.
55. D'Andrea, M.M., et al., *phiBO1E, a newly discovered lytic bacteriophage targeting carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae of the pandemic Clonal Group 258 clade II lineage*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 2614.
56. Kaase, M., et al., *Multicentre investigation of carbapenemase-producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae in German hospitals*. Int J Med Microbiol, 2016. **306**(6): p. 415-20.
57. Stolle, I., et al., *Emergence of OXA-48 carbapenemase-producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae in dogs*. J Antimicrob Chemother, 2013. **68**(12): p. 2802-8.
58. Ewers, C., et al., *Clonal spread of highly successful ST15-CTX-M-15 Klebsiella pneumoniae in companion animals and horses*. J Antimicrob Chemother, 2014. **69**(10): p. 2676-80.

- 
59. Chang, F.Y. and M.Y. Chou, *Comparison of pyogenic liver abscesses caused by Klebsiella pneumoniae and non-K. pneumoniae pathogens*. J Formos Med Assoc, 1995. **94**(5): p. 232-7.
60. Ko, W.C., et al., *Community-acquired Klebsiella pneumoniae bacteremia: global differences in clinical patterns*. Emerg Infect Dis, 2002. **8**(2): p. 160-6.
61. Shon, A.S., R.P. Bajwa, and T.A. Russo, *Hypervirulent (hypermucoviscous) Klebsiella pneumoniae: a new and dangerous breed*. Virulence, 2013. **4**(2): p. 107-18.
62. Russo, T.A. and C.M. Marr, *Hypervirulent Klebsiella pneumoniae*. Clin Microbiol Rev, 2019. **32**(3).
63. Bengoechea, J.A. and J. Sa Pessoa, *Klebsiella pneumoniae infection biology: living to counteract host defences*. FEMS Microbiol Rev, 2019. **43**(2): p. 123-144.
64. Ko, W.-C., et al., *Community-acquired Klebsiella pneumoniae bacteremia: global differences in clinical patterns*. Emerging infectious diseases, 2002. **8**(2): p. 160.
65. Paczosa, M.K. and J. Mecsas, *Klebsiella pneumoniae: Going on the Offense with a Strong Defense*. Microbiol Mol Biol Rev, 2016. **80**(3): p. 629-61.
66. Patel, P.K., T.A. Russo, and A.W. Karchmer, *Hypervirulent Klebsiella pneumoniae*. Open Forum Infect Dis, 2014. **1**(1): p. ofu028.
67. Choby, J.E., J. Howard-Anderson, and D.S. Weiss, *Hypervirulent Klebsiella pneumoniae - clinical and molecular perspectives*. J Intern Med, 2020. **287**(3): p. 283-300.
68. Catalan-Najera, J.C., U. Garza-Ramos, and H. Barrios-Camacho, *Hypervirulence and hypermucoviscosity: Two different but complementary Klebsiella spp. phenotypes?* Virulence, 2017. **8**(7): p. 1111-1123.
69. Lee, C.R., et al., *Antimicrobial Resistance of Hypervirulent Klebsiella pneumoniae: Epidemiology, Hypervirulence-Associated Determinants, and Resistance Mechanisms*. Front Cell Infect Microbiol, 2017. **7**: p. 483.
70. Dong, N., et al., *Carriage of bla KPC-2 by a virulence plasmid in hypervirulent Klebsiella pneumoniae*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2018. **73**(12): p. 3317-3321.
71. Feng, Y., et al., *Carbapenem-resistant hypervirulent Klebsiella pneumoniae of sequence type 36*. Antimicrobial agents and chemotherapy, 2018. **62**(7).
72. Gu, D., et al., *A fatal outbreak of ST11 carbapenem-resistant hypervirulent Klebsiella pneumoniae in a Chinese hospital: a molecular epidemiological study*. The Lancet infectious diseases, 2018. **18**(1): p. 37-46.
73. Shen, D., et al., *Emergence of a Multidrug-Resistant Hypervirulent Klebsiella pneumoniae Sequence Type 23 Strain with a Rare bla<sub>CTX-M-24</sub>-Harboring Virulence Plasmid*. Antimicrob Agents Chemother, 2019. **63**(3).
74. Zhang, R., et al., *Emergence of carbapenem-resistant serotype K1 hypervirulent Klebsiella pneumoniae strains in China*. Antimicrobial agents and chemotherapy, 2016. **60**(1): p. 709-711.

- 
75. Bialek-Davenet, S., et al., *Genomic definition of hypervirulent and multidrug-resistant Klebsiella pneumoniae clonal groups*. Emerg Infect Dis, 2014. **20**(11): p. 1812-20.
  76. Russo, T.A., et al., *Identification of Biomarkers for Differentiation of Hypervirulent Klebsiella pneumoniae from Classical K. pneumoniae*. J Clin Microbiol, 2018. **56**(9).
  77. Fang, C.T., et al., *A novel virulence gene in Klebsiella pneumoniae strains causing primary liver abscess and septic metastatic complications*. J Exp Med, 2004. **199**(5): p. 697-705.
  78. Kumabe, A. and T. Kenzaka, *String test of hypervirulent Klebsiella pneumonia*. Qjm, 2014. **107**(12): p. 1053.
  79. Lee, C.H., et al., *Hypermucoviscosity associated with Klebsiella pneumoniae-mediated invasive syndrome: a prospective cross-sectional study in Taiwan*. International Journal of Infectious Diseases, 2010. **14**(8): p. E688-E692.
  80. Yu, W.L., et al., *Comparison of prevalence of virulence factors for Klebsiella pneumoniae liver abscesses between isolates with capsular K1/K2 and non-K1/K2 serotypes*. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2008. **62**(1): p. 1-6.
  81. Lee, H.C., et al., *Clinical implications of hypermucoviscosity phenotype in Klebsiella pneumoniae isolates: association with invasive syndrome in patients with community-acquired bacteraemia*. Journal of Internal Medicine, 2006. **259**(6): p. 606-614.
  82. Lin, Y.C., et al., *Assessment of hypermucoviscosity as a virulence factor for experimental Klebsiella pneumoniae infections: comparative virulence analysis with hypermucoviscosity-negative strain*. BMC Microbiology, 2011. **11**.
  83. Remya, P., M. Shanthi, and U. Sekar, *Occurrence and characterization of hyperviscous K1 and K2 serotype in Klebsiella pneumoniae*. J Lab Physicians, 2018. **10**(3): p. 283-288.
  84. Fung, C.P., et al., *A global emerging disease of Klebsiella pneumoniae liver abscess: is serotype K1 an important factor for complicated endophthalmitis?* Gut, 2002. **50**(3): p. 420-4.
  85. Lee, I.R., et al., *Differential host susceptibility and bacterial virulence factors driving Klebsiella liver abscess in an ethnically diverse population*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 29316.
  86. Liu, C. and J. Guo, *Hypervirulent Klebsiella pneumoniae (hypermucoviscous and aerobactin positive) infection over 6 years in the elderly in China: antimicrobial resistance patterns, molecular epidemiology and risk factor*. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials, 2019. **18**.
  87. Chuang, Y.C., M.F. Lee, and W.L. Yu, *Mycotic aneurysm caused by hypermucoviscous Klebsiella pneumoniae serotype K54 with sequence type 29: an emerging threat*. Infection, 2013. **41**(5): p. 1041-1044.
  88. Cubero, M., et al., *Hypervirulent Klebsiella pneumoniae clones causing bacteraemia in adults in a teaching hospital in Barcelona, Spain (2007-2013)*. Clin Microbiol Infect, 2016. **22**(2): p. 154-160.

- 
89. Guo, Y., et al., *Microbiological and Clinical Characteristics of Hypermucoviscous Klebsiella pneumoniae Isolates Associated with Invasive Infections in China*. Front Cell Infect Microbiol, 2017. **7**: p. 24.
  90. Lin, J.C., et al., *Genotypes and virulence in serotype K2 Klebsiella pneumoniae from liver abscess and non-infectious carriers in Hong Kong, Singapore and Taiwan*. Gut Pathogens, 2014. **6**.
  91. Qu, T.T., et al., *Clinical and microbiological characteristics of Klebsiella pneumoniae liver abscess in East China*. BMC Infect Dis, 2015. **15**: p. 161.
  92. Siu, L.K., et al., *Molecular Typing and Virulence Analysis of Serotype K1 Klebsiella pneumoniae Strains Isolated from Liver Abscess Patients and Stool Samples from Noninfectious Subjects in Hong Kong, Singapore, and Taiwan*. Journal of Clinical Microbiology, 2011. **49**(11): p. 3761-3765.
  93. Wu, K.M., et al., *Genome sequencing and comparative analysis of Klebsiella pneumoniae NTUH-K2044, a strain causing liver abscess and meningitis*. J Bacteriol, 2009. **191**(14): p. 4492-501.
  94. Chen, Y.T., et al., *Sequencing and analysis of the large virulence plasmid pLVPK of Klebsiella pneumoniae CG43*. Gene, 2004. **337**: p. 189-98.
  95. Lin, T.L., et al., *Characterization of integrative and conjugative element ICEkp1-associated genomic heterogeneity in a Klebsiella pneumoniae strain isolated from a primary liver abscess*. Journal of Bacteriology, 2008. **190**(2): p. 515-526.
  96. Tan, T.Y., et al., *Hypermucoviscosity, rmpA, and aerobactin are associated with community-acquired Klebsiella pneumoniae bacteremic isolates causing liver abscess in Singapore*. J Microbiol Immunol Infect, 2019. **52**(1): p. 30-34.
  97. Nassif, X., et al., *Positive control of colanic acid synthesis in Escherichia coli by rmpA and rmpB, two virulence-plasmid genes of Klebsiella pneumoniae*. Mol Microbiol, 1989. **3**(10): p. 1349-59.
  98. Nassif, X. and P.J. Sansonetti, *Correlation of the virulence of Klebsiella pneumoniae K1 and K2 with the presence of a plasmid encoding aerobactin*. Infect Immun, 1986. **54**(3): p. 603-8.
  99. Lai, Y.C., et al., *Genotoxic Klebsiella pneumoniae in Taiwan*. PLoS One, 2014. **9**(5): p. e96292.
  100. Walker, K.A., et al., *The Small Protein RmpD Drives Hypermucoviscosity in Klebsiella pneumoniae*. mBio, 2020. **11**(5).
  101. Nassif, X., et al., *Mucoid Phenotype of Klebsiella-Pneumoniae Is a Plasmid-Encoded Virulence Factor*. Infection and Immunity, 1989. **57**(2): p. 546-552.
  102. Yeh, K.M., et al., *Capsular serotype K1 or K2, rather than magA and rmpA, is a major virulence determinant for Klebsiella pneumoniae liver abscess in Singapore and Taiwan*. Journal of Clinical Microbiology, 2007. **45**(2): p. 466-471.
  103. Wacharotayankun, R., et al., *Enhancement of Extracapsular Polysaccharide Synthesis in Klebsiella-Pneumoniae by RmpA2, Which Shows Homology to Ntrc and Fixj*. Infection and Immunity, 1993. **61**(8): p. 3164-3174.



- 
104. Lai, Y.C., H.L. Peng, and H.Y. Chang, *RmpA2, an activator of capsule biosynthesis in Klebsiella pneumoniae CG43, regulates K2 cps gene expression at the transcriptional level*. Journal of Bacteriology, 2003. **185**(3): p. 788-800.
105. Zughaier, S.M. and P. Cornelis, *Editorial: Role of Iron in Bacterial Pathogenesis*. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2018. **8**.
106. Miethke, M. and M.A. Marahiel, *Siderophore-based iron acquisition and pathogen control*. Microbiol Mol Biol Rev, 2007. **71**(3): p. 413-51.
107. Fischbach, M.A., et al., *How pathogenic bacteria evade mammalian sabotage in the battle for iron*. Nat Chem Biol, 2006. **2**(3): p. 132-8.
108. Lamb, A.L., *Breaking a pathogen's iron will: Inhibiting siderophore production as an antimicrobial strategy*. Biochim Biophys Acta, 2015. **1854**(8): p. 1054-70.
109. Russo, T.A., et al., *Aerobactin Mediates Virulence and Accounts for Increased Siderophore Production under Iron-Limiting Conditions by Hypervirulent (Hypermucoviscous) Klebsiella pneumoniae*. Infection and Immunity, 2014. **82**(6): p. 2356-2367.
110. Crumbliss, A.L. and J.M. Harrington, *Iron Sequestration by Small Molecules: Thermodynamic and Kinetic Studies of Natural Siderophores and Synthetic Model Compounds*. Advances in Inorganic Chemistry, Vol 61: Metal Ion Controlled Reactivity, 2009. **61**: p. 179-250.
111. Lawlor, M.S., C. O'Connor, and V.L. Miller, *Yersiniabactin is a virulence factor for Klebsiella pneumoniae during pulmonary infection*. Infection and Immunity, 2007. **75**(3): p. 1463-1472.
112. Smith, K.D., *Iron metabolism at the host pathogen interface: Lipocalin 2 and the pathogen-associated iroA gene cluster*. International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2007. **39**(10): p. 1776-1780.
113. Bachman, M.A., et al., *Interaction of lipocalin 2, transferrin, and siderophores determines the replicative niche of Klebsiella pneumoniae during pneumonia*. mBio, 2012. **3**(6).
114. Russo, T.A., et al., *Aerobactin, but Not Yersiniabactin, Salmochelin, or Enterobactin, Enables the Growth/Survival of Hypervirulent (Hypermucoviscous) Klebsiella pneumoniae Ex Vivo and In Vivo*. Infection and Immunity, 2015. **83**(8): p. 3325-3333.
115. Brock, J.H., et al., *Relative availability of transferrin-bound iron and cell-derived iron to aerobactin-producing and enterochelin-producing strains of Escherichia coli and to other microorganisms*. Infect Immun, 1991. **59**(9): p. 3185-90.
116. Lu, M.C., et al., *Colibactin Contributes to the Hypervirulence of pks(+) K1 CC23 Klebsiella pneumoniae in Mouse Meningitis Infections*. Front Cell Infect Microbiol, 2017. **7**: p. 103.
117. Putze, J., et al., *Genetic Structure and Distribution of the Colibactin Genomic Island among Members of the Family Enterobacteriaceae*. Infection and Immunity, 2009. **77**(11): p. 4696-4703.
118. Struve, C., et al., *Mapping the Evolution of Hypervirulent Klebsiella pneumoniae*. mBio, 2015. **6**(4): p. e00630.

- 
119. Lau, H.Y., G.B. Huffnagle, and T.A. Moore, *Host and microbiota factors that control Klebsiella pneumoniae mucosal colonization in mice*. Microbes and Infection, 2008. **10**(12-13): p. 1283-1290.
120. Sequeira, R.P., et al., *Commensal Bacteroidetes protect against Klebsiella pneumoniae colonization and transmission through IL-36 signalling*. Nature Microbiology, 2020. **5**(2): p. 304-+.
121. Gorrie, C.L., et al., *Gastrointestinal Carriage Is a Major Reservoir of Klebsiella pneumoniae Infection in Intensive Care Patients*. Clinical Infectious Diseases, 2017. **65**(2): p. 208-215.
122. Casewell, M. and I. Phillips, *Hands as Route of Transmission for Klebsiella Species*. British Medical Journal, 1977. **2**(6098): p. 1315-1317.
123. Filius, P.M., et al., *Colonization and resistance dynamics of gram-negative bacteria in patients during and after hospitalization*. Antimicrob Agents Chemother, 2005. **49**(7): p. 2879-86.
124. Martin, R.M., et al., *Molecular Epidemiology of Colonizing and Infecting Isolates of Klebsiella pneumoniae*. mSphere, 2016. **1**(5).
125. Cano, V., et al., *Klebsiella pneumoniae triggers a cytotoxic effect on airway epithelial cells*. BMC Microbiol, 2009. **9**: p. 156.
126. Maresso, A.W., *Bacterial Invasion of the Host Cell, in Bacterial Virulence*. 2019, Springer. p. 89-102.
127. Dersch, P., *Zelluläre Invasion Eine bakterielle Überlebensstrategie*. Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz, 2002. **45**(7): p. 577-582.
128. Rosen, D.A., et al., *Molecular variations in Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli FimH affect function and pathogenesis in the urinary tract*. Infect Immun, 2008. **76**(7): p. 3346-56.
129. Lin, W.H., et al., *Clinical and microbiological characteristics of Klebsiella pneumoniae from community-acquired recurrent urinary tract infections*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2014. **33**(9): p. 1533-9.
130. Jiang, L., et al., *Clearance of intracellular Klebsiella pneumoniae infection using gentamicin-loaded nanoparticles*. Journal of Controlled Release, 2018. **279**: p. 316-325.
131. Hsu, C.R., et al., *Klebsiella pneumoniae translocates across the intestinal epithelium via Rho GTPase- and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent cell invasion*. Infect Immun, 2015. **83**(2): p. 769-79.
132. Doorduijn, D.J., et al., *Complement resistance mechanisms of Klebsiella pneumoniae*. Immunobiology, 2016. **221**(10): p. 1102-1109.
133. Lawlor, M.S., S.A. Handley, and V.L. Miller, *Comparison of the host responses to wild-type and cpsB mutant Klebsiella pneumoniae infections*. Infection and Immunity, 2006. **74**(9): p. 5402-5407.
134. Rendueles, O., *Deciphering the role of the capsule of Klebsiella pneumoniae during pathogenesis: A cautionary tale*. Molecular Microbiology, 2020. **113**(5): p. 883-888.

- 
135. Sahly, H., Y. Keisari, and I. Ofek, *Manno(rhamno)biose-containing capsular polysaccharides of Klebsiella pneumoniae enhance opsono-stimulation of human polymorphonuclear leukocytes*. J Innate Immun, 2009. **1**(2): p. 136-44.
136. Lee, C.H., et al., *Sialic acid involved in hypermucoviscosity phenotype of Klebsiella pneumoniae and associated with resistance to neutrophil phagocytosis*. Virulence, 2014. **5**(6): p. 673-679.
137. Hsieh, P.F., et al., *Klebsiella pneumoniae peptidoglycan-associated lipoprotein and murein lipoprotein contribute to serum resistance, antiphagocytosis, and proinflammatory cytokine stimulation*. J Infect Dis, 2013. **208**(10): p. 1580-9.
138. Soto, E., et al., *Phenotypic and Genotypic Characterization of Klebsiella Pneumoniae Isolates Recovered from Nonhuman Primates*. Journal of Wildlife Diseases, 2012. **48**(3): p. 603-611.
139. Munoz, M.A., et al., *Fecal shedding of Klebsiella pneumoniae by dairy cows*. J Dairy Sci, 2006. **89**(9): p. 3425-30.
140. Podschun, R., I. Penner, and U. Ullmann, *Interaction of Klebsiella capsule type 7 with human polymorphonuclear leucocytes*. Microb Pathog, 1992. **13**(5): p. 371-9.
141. Sahly, H., et al., *Extended-spectrum beta-lactamase production is associated with an increase in cell invasion and expression of fimbrial adhesins in Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother, 2008. **52**(9): p. 3029-34.
142. Cheng, H.Y., et al., *RmpA regulation of capsular polysaccharide biosynthesis in Klebsiella pneumoniae CG43*. J Bacteriol, 2010. **192**(12): p. 3144-58.
143. Lin, Z.W., et al., *Characteristics of Hypervirulent Klebsiella pneumoniae: Does Low Expression of rmpA Contribute to the Absence of Hypervirulence?* Frontiers in Microbiology, 2020. **11**.
144. Cianfanelli, F.R., O. Cunrath, and D. Bumann, *Efficient dual-negative selection for bacterial genome editing*. BMC Microbiol, 2020. **20**(1): p. 129.
145. Spindler-Raffel, E., et al., *Enlargement of the WHO international repository for platelet transfusion-relevant bacteria reference strains*. Vox Sang, 2017. **112**(8): p. 713-722.
146. Pichler, C., et al., *First report of invasive liver abscess syndrome with endophthalmitis caused by a K2 serotype ST2398 hypervirulent Klebsiella pneumoniae in Germany, 2016*. New Microbes New Infect, 2017. **17**: p. 77-80.
147. Klaper, K., et al., *Hypervirulent Klebsiella pneumoniae of Lineage ST66-K2 Caused Tonsillopharyngitis in a German Patient*. Microorganisms, 2021. **9**(1).
148. Pietsch, M., et al., *Genome-Based Analyses of Fitness Effects and Compensatory Changes Associated with Acquisition of bla<sub>CMY</sub>-, bla<sub>CTX-M</sub>-, and bla<sub>OXA-48/VIM-1</sub>-Containing Plasmids in Escherichia coli*. Antibiotics, 2021. **10**(1): p. 90.
149. Cunrath, O., et al., *Quantitative contribution of efflux to multi-drug resistance of clinical Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa strains*. Ebiomedicine, 2019. **41**: p. 479-487.

- 
150. Bolger, A.M., M. Lohse, and B. Usadel, *Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data*. Bioinformatics, 2014. **30**(15): p. 2114-20.
  151. Munk, K., et al., *Mikrobiologie (Taschenlehrbuch Biologie)*. 2008, Stuttgart: Thieme.
  152. Calvin, N.M. and P.C. Hanawalt, *High-efficiency transformation of bacterial cells by electroporation*. J Bacteriol, 1988. **170**(6): p. 2796-801.
  153. Zhai, Y., et al., *Relative Strengths and Regulation of Different Promoter-Associated Sequences for Various bla(SHV) Genes and Their Relationships to beta-Lactam Resistance*. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, 2017. **27**(2): p. 91-101.
  154. Lam, M.M.C., et al., *Genomic surveillance framework and global population structure for Klebsiella pneumoniae*. bioRxiv, 2020: p. 2020.12.14.422303.
  155. Junemann, S., et al., *Updating benchtop sequencing performance comparison*. Nat Biotechnol, 2013. **31**(4): p. 294-6.
  156. Wick, R.R., et al., *Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads*. PLoS Comput Biol, 2017. **13**(6): p. e1005595.
  157. Rodrigues, C., et al., *Community-acquired infection caused by the uncommon hypervirulent Klebsiella pneumoniae ST66-K2 lineage*. Microb Genom, 2020. **6**(8).
  158. Orskov, I. and F. Orskov, *Serotyping of Klebsiella*. Methods in Microbiology, 1984. **14**: p. 143-164.
  159. Murashko, O.N. and S. Lin-Chao, *Escherichia coli responds to environmental changes using enolase degradosomes and stabilized DicF sRNA to alter cellular morphology*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2017. **114**(38): p. E8025-E8034.
  160. Yang, D.C., K.M. Blair, and N.R. Salama, *Staying in Shape: the Impact of Cell Shape on Bacterial Survival in Diverse Environments*. Microbiol Mol Biol Rev, 2016. **80**(1): p. 187-203.
  161. Marteyn, B., et al., *Breathing life into pathogens: the influence of oxygen on bacterial virulence and host responses in the gastrointestinal tract*. Cell Microbiol, 2011. **13**(2): p. 171-6.
  162. Davis, G.S. and L.B. Price, *Recent Research Examining Links Among Klebsiella pneumoniae from Food, Food Animals, and Human Extraintestinal Infections*. Current Environmental Health Reports, 2016. **3**(2): p. 128-135.
  163. Calbo, E., et al., *Foodborne nosocomial outbreak of SHV1 and CTX-M-15-producing Klebsiella pneumoniae: epidemiology and control*. Clinical infectious diseases, 2011. **52**(6): p. 743-749.
  164. Kim, S.-H., et al., *Multidrug-resistant Klebsiella pneumoniae isolated from farm environments and retail products in Oklahoma*. Journal of food protection, 2005. **68**(10): p. 2022-2029.
  165. Falomir, M.P., H. Rico, and D. Gozalbo, *Enterobacter and Klebsiella species isolated from fresh vegetables marketed in Valencia (Spain) and their clinically relevant resistances to chemotherapeutic agents*. Foodborne pathogens and disease, 2013. **10**(12): p. 1002-1007.

- 
166. Hartantyo, S.H.P., et al., *Foodborne Klebsiella pneumoniae: Virulence Potential, Antibiotic Resistance, and Risks to Food Safety*. J Food Prot, 2020. **83**(7): p. 1096-1103.
167. Marques, C., et al., *Evidence of Sharing of Klebsiella pneumoniae Strains between Healthy Companion Animals and Cohabiting Humans*. J Clin Microbiol, 2019. **57**(6).
168. Marques, C., et al., *Klebsiella pneumoniae causing urinary tract infections in companion animals and humans: population structure, antimicrobial resistance and virulence genes*. J Antimicrob Chemother, 2019. **74**(3): p. 594-602.
169. Passet, V. and S. Brisse, *Description of Klebsiella grimontii sp. nov.* Int J Syst Evol Microbiol, 2018. **68**(1): p. 377-381.
170. Liu, L., et al., *Klebsiella grimontii, a New Species Acquired Carbapenem Resistance*. Front Microbiol, 2018. **9**: p. 2170.
171. Pinto, N.A., et al., *Whole genome and transcriptome analysis reveal MALDI-TOF MS and SDS-PAGE have limited performance for the detection of the key outer membrane protein in carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae isolates*. Oncotarget, 2017. **8**(49): p. 84818-84826.
172. Rodrigues, C., et al., *Identification of Klebsiella pneumoniae, Klebsiella quasipneumoniae, Klebsiella variicola and Related Phylogroups by MALDI-TOF Mass Spectrometry*. Front Microbiol, 2018. **9**: p. 3000.
173. Zhang, S., et al., *Phenotypic and Genotypic Characterization of Klebsiella pneumoniae Isolated From Retail Foods in China*. Front Microbiol, 2018. **9**: p. 289.
174. Guo, Y., et al., *Frequency, Antimicrobial Resistance and Genetic Diversity of Klebsiella pneumoniae in Food Samples*. PLoS One, 2016. **11**(4): p. e0153561.
175. Aarestrup, F.M., P.F. McDermott, and H.C. Wegener, *Transmission of Antibiotic Resistance from Food Animals to Humans*, in *Campylobacter* , Third Edition. 2008, American Society of Microbiology.
176. Vidovic, N. and S. Vidovic, *Antimicrobial Resistance and Food Animals: Influence of Livestock Environment on the Emergence and Dissemination of Antimicrobial Resistance*. Antibiotics (Basel), 2020. **9**(2).
177. Rahman, M.M., et al., *Isolation and molecular characterization of multidrug-resistant Escherichia coli from chicken meat*. Sci Rep, 2020. **10**(1): p. 21999.
178. Irrgang, A., et al., *Prevalence of mcr-1 in E. coli from Livestock and Food in Germany, 2010-2015*. PLoS One, 2016. **11**(7): p. e0159863.
179. Kaesbohrer, A., et al., *Diversity in prevalence and characteristics of ESBL/pAmpC producing E. coli in food in Germany*. Vet Microbiol, 2019. **233**: p. 52-60.
180. Neumann, B., et al., *Genome sequences of two clinical Escherichia coli isolates harboring the novel colistin-resistance gene variants mcr-1.26 and mcr-1.27*. Gut Pathog, 2020. **12**: p. 40.

- 
181. Poirel, L., et al., *The mgrB gene as a key target for acquired resistance to colistin in Klebsiella pneumoniae*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2014. **70**(1): p. 75-80.
  182. Lippa, A.M. and M. Goulian, *Feedback inhibition in the PhoQ/PhoP signaling system by a membrane peptide*. PLoS Genet, 2009. **5**(12): p. e1000788.
  183. Kang, K.N., et al., *Colistin heteroresistance in Enterobacter cloacae is regulated by PhoPQ-dependent 4-amino-4-deoxy-L-arabinose addition to lipid A*. Molecular Microbiology, 2019. **111**(6): p. 1604-1616.
  184. Cannatelli, A., et al., *MgrB Inactivation Is a Common Mechanism of Colistin Resistance in KPC-Producing Klebsiella pneumoniae of Clinical Origin*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2014. **58**(10): p. 5696-5703.
  185. Lam, M.M.C., et al., *Tracking key virulence loci encoding aerobactin and salmochelin siderophore synthesis in Klebsiella pneumoniae*. Genome Med, 2018. **10**(1): p. 77.
  186. Fazili, T., et al., *Klebsiella pneumoniae Liver Abscess: An Emerging Disease*. Am J Med Sci, 2016. **351**(3): p. 297-304.
  187. Marr, C.M. and T.A. Russo, *Hypervirulent Klebsiella pneumoniae: a new public health threat*. Expert Rev Anti Infect Ther, 2019. **17**(2): p. 71-73.
  188. Shi, Q., et al., *Diversity of virulence level phenotype of hypervirulent Klebsiella pneumoniae from different sequence type lineage*. BMC Microbiol, 2018. **18**(1): p. 94.
  189. Baekby, M., et al., *Hypervirulent Klebsiella pneumoniae K1 liver abscess and endogenous endophthalmitis in a Caucasian man*. Clin Case Rep, 2018. **6**(8): p. 1618-1623.
  190. Li, J., et al., *Risk factors and clinical outcomes of hypervirulent Klebsiella pneumoniae induced bloodstream infections*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2018. **37**(4): p. 679-689.
  191. Riquelme, S.A., D. Ahn, and A. Prince, *Pseudomonas aeruginosa and Klebsiella pneumoniae Adaptation to Innate Immune Clearance Mechanisms in the Lung*. Journal of Innate Immunity, 2018. **10**(5-6): p. 442-454.
  192. Marcoleta, A.E., et al., *Evaluating Different Virulence Traits of Klebsiella pneumoniae Using Dictyostelium discoideum and Zebrafish Larvae as Host Models*. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2018. **8**: p. 30.
  193. Tang, M., et al., *Epidemiological Characteristics and Formation Mechanisms of Multidrug-Resistant Hypervirulent Klebsiella pneumoniae*. Frontiers in Microbiology, 2020. **11**(2774).
  194. Yang, Y., et al., *Characterization of a hypervirulent multidrug-resistant ST23 Klebsiella pneumoniae carrying a bla<sub>CTX-M-24</sub> IncFII plasmid and a pK2044-like plasmid*. Journal of Global Antimicrobial Resistance, 2020. **22**: p. 674-679.
  195. Harada, S. and Y. Doi, *Hypervirulent Klebsiella pneumoniae: a Call for Consensus Definition and International Collaboration*. J Clin Microbiol, 2018. **56**(9).

- 
196. Pan, Y.J., et al., *Capsular polysaccharide synthesis regions in Klebsiella pneumoniae serotype K57 and a new capsular serotype*. J Clin Microbiol, 2008. **46**(7): p. 2231-40.
197. Lev, A.I., et al., *Comparative analysis of Klebsiella pneumoniae strains isolated in 2012-2016 that differ by antibiotic resistance genes and virulence genes profiles*. Pathog Glob Health, 2018. **112**(3): p. 142-151.
198. Feldman, M.F., et al., *A promising bioconjugate vaccine against hypervirulent Klebsiella pneumoniae*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2019. **116**(37): p. 18655-18663.
199. Wyres, K.L., et al., *Distinct evolutionary dynamics of horizontal gene transfer in drug resistant and virulent clones of Klebsiella pneumoniae*. PLoS Genet, 2019. **15**(4): p. e1008114.
200. Lery, L.M., et al., *Comparative analysis of Klebsiella pneumoniae genomes identifies a phospholipase D family protein as a novel virulence factor*. BMC Biol, 2014. **12**: p. 41.
201. Meatherall, B.L., et al., *Incidence, risk factors, and outcomes of Klebsiella pneumoniae bacteremia*. Am J Med, 2009. **122**(9): p. 866-73.
202. Jiao, Y., et al., *Risk factors for carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae infection/colonization and predictors of mortality: a retrospective study*. Pathog Glob Health, 2015. **109**(2): p. 68-74.
203. Cienfuegos-Gallet, A.V., et al., *Risk factors and survival of patients infected with carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae in a KPC endemic setting: a case-control and cohort study*. BMC Infect Dis, 2019. **19**(1): p. 830.
204. Cayron, J., A. Dedieu, and C. Lesterlin, *Bacterial filament division dynamics allows rapid post-stress cell proliferation*. bioRxiv, 2020: p. 2020.03.16.993345.
205. Klein, K., et al., *Quantification of filamentation by uropathogenic Escherichia coli during experimental bladder cell infection by using semi-automated image analysis*. J Microbiol Methods, 2015. **109**: p. 110-6.
206. Justice, S.S., et al., *Morphological plasticity as a bacterial survival strategy*. Nature Reviews Microbiology, 2008. **6**(2): p. 162-168.
207. Sun, Q.L., et al., *Dynamic Colonization of Klebsiella pneumoniae Isolates in Gastrointestinal Tract of Intensive Care Patients*. Front Microbiol, 2019. **10**: p. 230.
208. Sahly, H., et al., *Capsule impedes adhesion to and invasion of epithelial cells by Klebsiella pneumoniae*. Infect Immun, 2000. **68**(12): p. 6744-9.
209. Struve, C. and K.A. Krogfelt, *Role of capsule in Klebsiella pneumoniae virulence: lack of correlation between in vitro and in vivo studies*. FEMS Microbiology Letters, 2003. **218**(1): p. 149-154.
210. Cortes, G., et al., *Role of lung epithelial cells in defense against Klebsiella pneumoniae pneumonia*. Infect Immun, 2002. **70**(3): p. 1075-80.
211. de Astorza, B., et al., *C3 promotes clearance of Klebsiella pneumoniae by A549 epithelial cells*. Infect Immun, 2004. **72**(3): p. 1767-74.

- 
212. Fumagalli, O., *Charakterisierung des Invasionsprozesses von Klebsiella pneumoniae in humane Epithelzellen*. 1998.
213. Wyres, K.L., et al., *Genomic surveillance for hypervirulence and multi-drug resistance in invasive Klebsiella pneumoniae from South and Southeast Asia*. Genome Med, 2020. **12**(1): p. 11.
214. Evangelista, V., et al., *Klebsiella pneumoniae Invasive Syndrome*. Eur J Case Rep Intern Med, 2018. **5**(3): p. 000800.
215. Secher, T., et al., *Oral Tolerance Failure upon Neonatal Gut Colonization with Escherichia coli Producing the Genotoxin Colibactin*. Infection and Immunity, 2015. **83**(6): p. 2420-2429.
216. Huynh, D.T.N., A.Y. Kim, and Y.R. Kim, *Identification of Pathogenic Factors in Klebsiella pneumoniae Using Impedimetric Sensor Equipped with Biomimetic Surfaces*. Sensors (Basel), 2017. **17**(6).
217. Kabha, K., et al., *Relationships among capsular structure, phagocytosis, and mouse virulence in Klebsiella pneumoniae*. Infect Immun, 1995. **63**(3): p. 847-52.
218. Domenico, P., et al., *Polysaccharide capsule-mediated resistance to opsonophagocytosis in Klebsiella pneumoniae*. Infect Immun, 1994. **62**(10): p. 4495-9.
219. Álvarez, D., et al., *Capsular Polysaccharide Is a Major Complement Resistance Factor in Lipopolysaccharide O Side Chain-Deficient Klebsiella pneumoniae Clinical Isolates*. Infection and Immunity, 2000. **68**(2): p. 953-955.
220. Prashar, A., et al., *Filamentous morphology of bacteria delays the timing of phagosome morphogenesis in macrophages*. J Cell Biol, 2013. **203**(6): p. 1081-97.
221. Cano, V., et al., *Klebsiella pneumoniae survives within macrophages by avoiding delivery to lysosomes*. Cellular Microbiology, 2015. **17**(11): p. 1537-1560.
222. Price, J.V. and R.E. Vance, *The macrophage paradox*. Immunity, 2014. **41**(5): p. 685-93.
223. Russo, T.A., et al., *An Assessment of Siderophore Production, Mucoviscosity, and Mouse Infection Models for Defining the Virulence Spectrum of Hypervirulent Klebsiella pneumoniae*. mSphere, 2021. **6**(2).
224. Mellmann, A., et al., *Genome Sequences of the First WHO Repository of Platelet Transfusion-Relevant Bacterial Reference Strains*. Genome Announc, 2017. **5**(29).
225. Hsu, C.R., et al., *The role of Klebsiella pneumoniae rmpA in capsular polysaccharide synthesis and virulence revisited*. Microbiology (Reading), 2011. **157**(Pt 12): p. 3446-3457.
226. Lin, T.H., et al., *FNR-Dependent RmpA and RmpA2 Regulation of Capsule Polysaccharide Biosynthesis in Klebsiella pneumoniae*. Frontiers in Microbiology, 2019. **10**.
227. Lin, C.T., et al., *Fur regulation of the capsular polysaccharide biosynthesis and iron-acquisition systems in Klebsiella pneumoniae CG43*. Microbiology (Reading), 2011. **157**(Pt 2): p. 419-429.



## Anhang

**Tabelle A 1: Übersicht über Antibiotikaempfindlichkeiten der im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten 94 *Klebsiella* spp.-Isolate von Lebensmitteln und Tieren.**

ID: BfR Isolatnummer; MALDI-TOF: Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation; WGS: Ganzgenomanalyse (*whole genome sequencing*); Ursprung: Isolationsort; AMP: Ampicillin; AZI: Azithromycin; CHL: Chloramphenicol; CIP: Ciprofloxacin; COL: Colistin; FOT: Cefotaxim; GEN: Gentamicin; MERO: Meropenem; NAL: Nalidixinsäure; SMX: Sulfamethoxazol; TAZ: Ceftazidim; TET: Tetrazyklin; TIG: Tigazyklin; n.a.: nicht angegeben

ID	Speziesidentifikation	Ursprung	Minimale Hemm-Konzentration (Angaben in mg/L)												
	MALDI-TOF		AMP	AZI	CHL	CIP	COL	FOT	GEN	MERO	NAL	SMX	TAZ	TET	TIG
283	<i>K. pneumoniae</i>	n.a.	>32	16	<=8	0.03	<=1	<=0.25	<=0.5	<=0.03	<=4	16	<=0.5	<=2	0.5
1678	<i>K. pneumoniae</i>	Rind	>64	8	<=8	0.03	<=1	>4	8	<=0.03	<=4	<=8	4	<=2	<=0.25
1701	<i>K. pneumoniae</i>	Schweinefleisch	32	8	<=8	<=0.015	<=1	<=0.25	<=0.5	<=0.03	<=4	16	<=0.5	<=2	<=0.25
10109	<i>K. pneumoniae</i>	Rind	64	16	<=8	0.06	<=1	<=0.25	<=0.5	<=0.03	<=4	32	<=0.5	<=2	0.5
11213	<i>K. pneumoniae</i>	Schweinefleisch	32	16	<=8	0.06	<=1	<=0.25	<=0.5	<=0.03	<=4	32	<=0.5	<=2	0.5
11214	<i>K. pneumoniae</i>	Hase	32	16	<=8	0.06	<=1	<=0.25	<=0.5	<=0.03	<=4	16	<=0.5	<=2	0.5
11250	<i>K. pneumoniae</i>	Alpaka	>64	16	<=8	0.5	<=1	>4	16	<=0.03	8	>1024	<=0.5	>64	1
11251	<i>K. oxytoca</i>	Hund	4	8	<=8	0.03	<=1	<=0.25	<=0.5	<=0.03	<=4	<=8	<=0.5	<=2	<=0.25
11252	<i>K. pneumoniae</i>	Schweinefleisch	>64	16	<=8	0.03	<=1	0.5	<=0.5	<=0.03	<=4	16	<=0.5	>64	0.5
11260	<i>K. pneumoniae</i>	Schweinefleisch	8	8	<=8	<=0.015	<=1	<=0.25	1	<=0.03	<=4	<=8	<=0.5	<=2	<=0.25
11262	<i>K. pneumoniae</i>	Affe	32	8	<=8	0.03	<=1	0.5	<=0.5	<=0.03	<=4	<=8	<=0.5	<=2	<=0.25
11263	<i>K. oxytoca</i>	Schildkröte	2	16	<=8	0.03	<=1	<=0.25	<=0.5	<=0.03	<=4	<=8	<=0.5	<=2	<=0.25
11264	<i>K. pneumoniae</i>	Schweinefleisch	32	8	<=8	0.06	<=1	<=0.25	<=0.5	<=0.03	<=4	32	<=0.5	<=2	0.5
11265	<i>K. pneumoniae</i>	Schweinefleisch	>64	16	>128	>8	>16	>4	>32	<=0.03	>128	>1024	4	>64	1
11269	<i>K. pneumoniae</i>	Schweinefleisch	32	16	<=8	0.03	<=1	<=0.25	<=0.5	<=0.03	<=4	<=8	<=0.5	<=2	0.5
11324	<i>K. pneumoniae</i>	Schweinefleisch	32	16	<=8	0.03	<=1	<=0.25	<=0.5	<=0.03	<=4	16	<=0.5	<=2	<=0.25
11331	<i>K. pneumoniae</i>	Hund	32	16	<=8	0.06	<=1	<=0.25	<=0.5	<=0.03	<=4	<=8	<=0.5	<=2	0.5
11332	<i>K. oxytoca</i>	Reh	<=1	16	<=8	0.03	<=1	<=0.25	<=0.5	<=0.03	<=4	<=8	<=0.5	<=2	<=0.25
11333	<i>K. pneumoniae</i>	Wildschwein	32	8	<=8	0.03	<=1	<=0.25	<=0.5	<=0.03	<=4	32	<=0.5	<=2	<=0.25
11390	<i>K. oxytoca</i>	Schweinefleisch	32	16	<=8	<=0.015	<=1	<=0.25	<=0.5	<=0.03	<=4	1024	<=0.5	64	0.5
11425	<i>K. pneumoniae</i>	Truthahn	64	16	<=8	2	<=1	4	<=0.5	<=0.03	16	16	8	64	1
11463	<i>K. pneumoniae</i>	Kalb	32	16	<=8	0.06	<=1	<=0.25	<=0.5	<=0.03	<=4	16	<=0.5	<=2	<=0.25
11486	<i>K. oxytoca</i>	Igel	16	32	<=8	<=0.015	<=1	<=0.25	<=0.5	<=0.03	<=4	<=8	<=0.5	<=2	<=0.25
11487	<i>K. oxytoca</i>	Meerschwein	64	16	<=8	0.03	<=1	<=0.25	<=0.5	<=0.03	<=4	16	<=0.5	<=2	<=0.25
11496	<i>K. pneumoniae</i>	Kalb	32	16	<=8	0.03	<=1	<=0.25	<=0.5	<=0.03	<=4	<=8	<=0.5	<=2	<=0.25
11497	<i>K. pneumoniae</i>	Schweinefleisch	64	16	<=8	1	<=1	<=0.25	<=0.5	<=0.03	128	1024	<=0.5	64	0.5
11498	<i>K. pneumoniae</i>	Radieschen	64	16	<=8	4	<=1	4	<=0.5	0.06	16	1024	8	<=2	0.5
11519	<i>K. pneumoniae</i>	Schwein	32	16	<=8	0.03	<=1	<=0.25	<=0.5	<=0.03	<=4	<=8	<=0.5	<=2	0.5
11570	<i>K. pneumoniae</i>	Katze	64	16	<=8	0.03	<=1	<=0.25	<=0.5	<=0.03	<=4	16	<=0.5	<=2	0.5

ID	Speziesidentifikation MALDI-TOF	Ursprung	Minimale Hemm-Konzentration (Angaben in mg/L)												
			AMP	AZI	CHL	CIP	COL	FOT	GEN	MERO	NAL	SMX	TAZ	TET	TIG
11571	<i>K. pneumoniae</i>	Affe	64	16	<=8	0.03	<=1	<=0.25	<=0.5	<=0.03	<=4	16	<=0.5	<=2	<=0.25
11572	<i>K. oxytoca</i>	Schweinefleisch	32	16	<=8	<=0.015	<=1	<=0.25	<=0.5	<=0.03	<=4	1024	<=0.5	32	<=0.25
11648	<i>K. pneumoniae</i>	Känguru	32	16	<=8	0.06	<=1	<=0.25	<=0.5	<=0.03	<=4	32	<=0.5	4	<=0.25
11649	<i>K. pneumoniae</i>	Rind	32	16	<=8	0.06	<=1	<=0.25	<=0.5	<=0.03	<=4	16	<=0.5	4	<=0.25
11650	<i>K. pneumoniae</i>	Schweinefleisch	16	16	<=8	0.03	<=1	<=0.25	<=0.5	<=0.03	<=4	<=8	<=0.5	64	1
11677	<i>K. variicola</i>	Kalb	16	16	<=8	0.03	<=1	<=0.25	<=0.5	<=0.03	<=4	16	<=0.5	<=2	0.5
11678	<i>K. pneumoniae</i>	Schweinefleisch	32	16	<=8	0.03	<=1	<=0.25	<=0.5	<=0.03	<=4	<=8	<=0.5	<=2	0.5
11699	<i>K. oxytoca</i>	Rind	32	16	<=8	<=0.015	<=1	<=0.25	<=0.5	<=0.03	<=4	16	<=0.5	<=2	0.5
11714	<i>K. pneumoniae</i>	Radischen	16	16	<=8	0.03	<=1	<=0.25	<=0.5	<=0.03	<=4	16	<=0.5	<=2	0.5
11733	<i>K. pneumoniae</i>	Kalb	32	16	<=8	0.03	<=1	<=0.25	<=0.5	<=0.03	<=4	16	<=0.5	<=2	<=0.25
11890	<i>K. pneumoniae</i>	Schaf	32	16	<=8	0.03	<=1	<=0.25	<=0.5	<=0.03	<=4	<=8	<=0.5	<=2	<=0.25
30298	<i>K. pneumoniae</i>	Rind	16	16	<=8	0.03	<=1	<=0.25	<=0.5	<=0.03	<=4	16	<=0.5	<=2	0.5
30299	<i>K. pneumoniae</i>	Pferd	16	8	<=8	0.03	<=1	<=0.25	<=0.5	<=0.03	<=4	16	<=0.5	<=2	<=0.25
30300	<i>K. pneumoniae</i>	Pferd	32	16	<=8	0.03	<=1	<=0.25	<=0.5	<=0.03	<=4	16	<=0.5	<=2	<=0.25
30301	<i>K. pneumoniae</i>	Schwein	32	8	<=8	0.03	<=1	<=0.25	<=0.5	<=0.03	<=4	16	<=0.5	<=2	0.5
30327	<i>K. pneumoniae</i>	Wildschwein	64	16	<=8	0.03	<=1	<=0.25	<=0.5	<=0.03	<=4	16	<=0.5	<=2	<=0.25
30499	<i>K. pneumoniae</i>	Schweinefleisch	64	8	64	0.5	<=1	<=0.25	<=0.5	<=0.03	32	>1024	<=0.5	>64	2
10037_2	<i>K. oxytoca</i>	Schwein	2	8	16	0.06	<=1	<=0.25	<=0.5	<=0.03	8	<=8	<=0.5	<=2	<=0.25
10038_2	<i>K. oxytoca</i>	Hase	32	16	<=8	<=0.015	<=1	<=0.25	<=0.5	<=0.03	<=4	<=8	<=0.5	<=2	<=0.25
10088_2	<i>K. pneumoniae</i>	Wildschwein	32	16	<=8	0.03	<=1	<=0.25	<=0.5	<=0.03	<=4	<=8	<=0.5	<=2	<=0.25
10089_2	<i>K. pneumoniae</i>	Roe buck	32	8	<=8	0.03	<=1	<=0.25	<=0.5	<=0.03	<=4	16	<=0.5	<=2	<=0.25
10191_3	<i>K. oxytoca</i>	Hase	16	16	16	0.03	<=1	<=0.25	<=0.5	<=0.03	<=4	<=8	<=0.5	<=2	<=0.25
10591_2	<i>K. variicola</i>	Rind	16	16	<=8	0.06	<=1	<=0.25	<=0.5	<=0.03	<=4	16	<=0.5	<=2	0.5
10863_3	<i>K. pneumoniae</i>	Schwein	32	16	<=8	0.06	<=1	<=0.25	<=0.5	<=0.03	<=4	32	<=0.5	>64	1
10975_2	<i>K. oxytoca</i>	Schaf	4	8	<=8	<=0.015	2	<=0.25	<=0.5	<=0.03	<=4	16	<=0.5	<=2	<=0.25
11315_2	<i>K. oxytoca</i>	Igel	4	8	<=8	<=0.015	<=1	<=0.25	<=0.5	<=0.03	<=4	<=8	<=0.5	<=2	<=0.25
11316_2	<i>K. pneumoniae</i>	Schweinefleisch	32	8	<=8	0.03	<=1	<=0.25	<=0.5	<=0.03	<=4	16	<=0.5	<=2	<=0.25
11322_2	<i>K. pneumoniae</i>	Rind	32	64	128	8	<=1	<=0.25	<=0.5	<=0.03	128	1024	<=0.5	64	1
11560_2	<i>K. oxytoca</i>	Rind	64	32	<=8	0.03	<=1	<=0.25	<=0.5	<=0.03	<=4	32	<=0.5	4	0.5
11726_2	<i>K. pneumoniae</i>	Pferd	32	16	<=8	0.06	<=1	<=0.25	<=0.5	<=0.03	<=4	32	<=0.5	<=2	0.5
11744_2	<i>K. pneumoniae</i>	Schwein	32	8	<=8	0.03	<=1	<=0.25	1	<=0.03	<=4	16	<=0.5	<=2	<=0.25
1482_2	<i>K. pneumoniae</i>	Rind	32	16	<=8	0.03	<=1	<=0.25	<=0.5	<=0.03	<=4	16	<=0.5	<=2	<=0.25
14EP03163	<i>K. pneumoniae</i>	Huhn	32	16	<=8	0.03	<=1	<=0.25	<=0.5	<=0.03	<=4	32	<=0.5	<=2	0.5
1616_4	<i>K. pneumoniae</i>	Schwein	>64	8	<=8	0.06	<=1	<=0.25	<=0.5	<=0.03	<=4	>1024	<=0.5	>64	2
2404_3	<i>K. oxytoca</i>	Rind	32	16	<=8	0.03	<=1	<=0.25	<=0.5	<=0.03	<=4	16	<=0.5	<=2	<=0.25
2486_3	<i>K. oxytoca</i>	Rind	16	16	<=8	0.03	<=1	<=0.25	<=0.5	<=0.03	<=4	16	<=0.5	<=2	<=0.25
2513_3	<i>K. oxytoca</i>	Rind	32	16	<=8	<=0.015	<=1	<=0.25	<=0.5	<=0.03	<=4	32	<=0.5	<=2	0.5
30312_2	<i>K. pneumoniae</i>	Schwein	32	8	<=8	0.03	<=1	<=0.25	<=0.5	<=0.03	<=4	16	<=0.5	<=2	<=0.25
3306_3	<i>K. pneumoniae</i>	Schwein	32	8	<=8	0.03	<=1	<=0.25	<=0.5	<=0.03	<=4	16	<=0.5	<=2	0.5
3630_2	<i>K. pneumoniae</i>	Schweinefleisch	64	16	<=8	0.03	<=1	<=0.25	<=0.5	<=0.03	<=4	<=8	<=0.5	<=2	<=0.25

ID	Speziesidentifikation MALDI-TOF	Ursprung	Minimale Hemm-Konzentration (Angaben in mg/L)												
			AMP	AZI	CHL	CIP	COL	FOT	GEN	MERO	NAL	SMX	TAZ	TET	TIG
4062_2	<i>K. pneumoniae</i>	Schweinefleisch	32	16	<=8	0.03	<=1	<=0.25	<=0.5	<=0.03	<=4	1024	<=0.5	64	1
4804_2	<i>K. pneumoniae</i>	Rind	32	16	<=8	0.03	<=1	<=0.25	<=0.5	<=0.03	<=4	16	<=0.5	<=2	<=0.25
4872_2	<i>K. pneumoniae</i>	Rind	32	8	<=8	0.03	<=1	<=0.25	<=0.5	<=0.03	<=4	16	<=0.5	<=2	<=0.25
4886_2	<i>K. pneumoniae</i>	Kalb	32	16	<=8	0.03	<=1	<=0.25	<=0.5	<=0.03	<=4	16	<=0.5	<=2	0.5
4887_2	<i>K. pneumoniae</i>	Kalb	32	16	<=8	0.03	<=1	<=0.25	<=0.5	<=0.03	<=4	16	<=0.5	<=2	<=0.25
4888_2	<i>K. variicola</i>	Rind	8	16	<=8	0.03	<=1	<=0.25	<=0.5	<=0.03	<=4	8	<=0.5	<=2	<=0.25
4889_2	<i>K. pneumoniae</i>	Rind	32	16	<=8	0.03	<=1	<=0.25	<=0.5	<=0.03	<=4	16	<=0.5	4	<=0.25
4890_2	<i>K. variicola</i>	n.a.	16	16	<=8	0.03	<=1	<=0.25	<=0.5	<=0.03	<=4	<=8	<=0.5	<=2	0.5
5451_2	<i>K. pneumoniae</i>	Pferd	32	8	<=8	0.03	<=1	<=0.25	<=0.5	<=0.03	8	<=8	<=0.5	<=2	<=0.25
5452_2	<i>K. pneumoniae</i>	Kalb	32	8	<=8	0.06	<=1	<=0.25	<=0.5	<=0.03	<=4	16	<=0.5	<=2	0.5
5455_2	<i>K. pneumoniae</i>	Schweinefleisch	32	8	<=8	0.06	<=1	<=0.25	<=0.5	<=0.03	<=4	1024	<=0.5	64	1
5456_2	<i>K. pneumoniae</i>	Schweinefleisch	32	16	<=8	0.03	<=1	<=0.25	<=0.5	<=0.03	<=4	1024	<=0.5	64	0.5
5466_2	<i>K. oxytoca</i>	Schaf	16	16	<=8	0.03	<=1	<=0.25	<=0.5	<=0.03	<=4	<=8	<=0.5	<=2	0.5
5578_2	<i>K. pneumoniae</i>	Schwein	>64	16	<=8	0.03	<=1	<=0.25	<=0.5	<=0.03	<=4	16	<=0.5	4	0.5
5665_2	<i>K. pneumoniae</i>	Rind	16	8	<=8	0.03	<=1	<=0.25	<=0.5	<=0.03	<=4	<=8	<=0.5	<=2	<=0.25
5667_2	<i>K. pneumoniae</i>	Alpen Steinbock	64	16	<=8	0.06	<=1	<=0.25	<=0.5	<=0.03	<=4	<=8	<=0.5	<=2	0.5
5695_2	<i>K. pneumoniae</i>	Wüstenfuchs	64	16	<=8	0.03	<=1	<=0.25	<=0.5	<=0.03	<=4	16	<=0.5	<=2	<=0.25
5901_5	<i>K. pneumoniae</i>	Rind	32	8	<=8	0.03	<=1	<=0.25	<=0.5	<=0.03	<=4	16	<=0.5	<=2	<=0.25
6675_2	<i>K. oxytoca</i>	Rind	32	16	<=8	<=0.015	<=1	<=0.25	<=0.5	<=0.03	<=4	16	<=0.5	<=2	<=0.25
7090_4	<i>K. pneumoniae</i>	Hase	32	16	<=8	0.06	<=1	<=0.25	<=0.5	<=0.03	<=4	<=8	<=0.5	<=2	<=0.25
753_2	<i>K. pneumoniae</i>	Schweinefleisch	32	16	<=8	0.03	<=1	<=0.25	<=0.5	<=0.03	<=4	<=8	<=0.5	<=2	0.5
8162_2	<i>K. pneumoniae</i>	Rind	16	8	<=8	0.03	<=1	<=0.25	<=0.5	<=0.03	<=4	<=8	<=0.5	<=2	<=0.25
8534_2	<i>K. oxytoca</i>	Hase	16	16	<=8	0.03	<=1	<=0.25	<=0.5	<=0.03	<=4	16	<=0.5	<=2	<=0.25
9653_2	<i>K. pneumoniae</i>	Rind	32	8	<=8	0.03	<=1	<=0.25	<=0.5	<=0.03	8	16	<=0.5	<=2	0.5
9732_2	<i>K. oxytoca</i>	Rind	64	16	<=8	0.03	<=1	<=0.25	<=0.5	<=0.03	<=4	16	<=0.5	<=2	<=0.25

**Tabelle A 2: Übersicht über die aus Ganzgenomdaten identifizierten Eigenschaften der im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten *Klebsiella* spp.-Isolate von Lebensmitteln und Tieren.**

ID: BfR Isolatnummer; ESBL, *extended-spectrum beta-lactamase*; MLST, *multilocus sequence type*; n.a.: nicht angegeben; LV: Anzahl der Allelabweichungen zu bekannten Sequenztypen; \*Mutationen in der Promotorsequenz der ESBL-Gene resultieren in einem non-ESBL-Phänotyp.

ID BfR	Speziesidentifikation WGS	Sequence type (MLST)	Kapsel-Typ	Resistenzgene			Virulenzfaktoren				
				Beta-Laktamase-Gene	ESBL-gene	Col	ybt	iuc	iro	clb	rmpA/rmpA2
283	<i>K. pneumoniae</i>	ST20	KL22	<i>bla</i> <sub>SHV-1</sub>	-	-	-	-	-	-	-
1678	<i>K. pneumoniae</i>	ST107	KL107	<i>bla</i> <sub>SHV-1</sub>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>	-	-	-	-	-	-
1701	<i>K. pneumoniae</i>	ST3381-1LV	KL39	<i>bla</i> <sub>SHV-108</sub>	-	-	-	+	-	-	-
10109	<i>K. quasipneumoniae</i>	ST705	KL17	<i>bla</i> <sub>OKP-B-6</sub>	-	-	-	-	-	-	-
11213	<i>K. pneumoniae</i>	ST35	KL22	<i>bla</i> <sub>SHV-33</sub>	-	-	-	-	-	-	-
11214	<i>K. pneumoniae</i>	ST3175	KL30	<i>bla</i> <sub>SHV-215</sub>	-	-	-	-	-	-	-
11250	<i>K. pneumoniae</i>	ST1017	KL58	<i>bla</i> <sub>LAP-2</sub> ; <i>bla</i> <sub>SHV-11</sub>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-14</sub>	-	-	-	-	-	-
11251	<i>K. grimontii</i>	n.a.	KL29	<i>bla</i> <sub>OXY6-2</sub>	-	-	-	-	-	-	-
11252	<i>K. pneumoniae</i>	ST45	KL24	-	-	-	+	-	-	-	-
11260	<i>K. grimontii</i>	n.a.	KL29	<i>bla</i> <sub>OXY6-2</sub>	-	-	-	-	-	-	-
11262	<i>K. pneumoniae</i>	ST472-2LV	KL141	<i>bla</i> <sub>SHV-11</sub>	-	-	-	-	-	-	-
11263	<i>K. grimontii</i>	n.a.	KL26	<i>bla</i> <sub>OXY6-4</sub>	-	-	-	-	-	-	-
11264	<i>K. pneumoniae</i>	ST188-1LV	KL50	<i>bla</i> <sub>SHV-37</sub>	-	-	-	-	-	-	-
11265	<i>K. pneumoniae</i>	ST11	KL52	<i>bla</i> <sub>LAP-2</sub> ; <i>bla</i> <sub>SHV-11</sub>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-14</sub>	-	-	-	-	-	-
11269	<i>K. pneumoniae</i>	ST70-2LV	KL30	<i>bla</i> <sub>SHV-119</sub>	-	-	-	+	-	-	-
11324	<i>K. pneumoniae</i>	ST39	KL23	<i>bla</i> <sub>SHV-11</sub>	-	-	-	-	-	-	-
11331	<i>K. pneumoniae</i>	ST290	KL21	<i>bla</i> <sub>SHV-1</sub>	-	-	-	-	-	-	-
11332	<i>K. grimontii</i>	n.a.	KL26	<i>bla</i> <sub>OXY6-4</sub>	-	-	-	-	-	-	-
11333	<i>K. pneumoniae</i>	ST610	KL55	<i>bla</i> <sub>SHV-11</sub>	-	-	+	+	-	-	-
11390	<i>K. michiganensis</i>	n.a.	KL107	<i>bla</i> <sub>OXY1-5</sub>	-	-	-	-	-	-	-
11425	<i>K. pneumoniae</i>	ST13	KL3	<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>	-	-	-	-	-	-
11463	<i>K. pneumoniae</i>	ST109	KL30	<i>bla</i> <sub>SHV-194</sub>	-	-	-	-	-	-	-
11486	<i>K. michiganensis</i>	n.a.	KL68	<i>bla</i> <sub>OXY5-1</sub>	-	-	-	-	-	-	-
11487	<i>K. michiganensis</i>	n.a.	KL109	<i>bla</i> <sub>OXY1-1</sub>	-	-	-	-	-	-	-
11496	<i>K. pneumoniae</i>	ST46	KL35	-	<i>bla</i> <sub>SHV-27</sub> *	-	-	-	-	-	-
11497	<i>K. pneumoniae</i>	ST107	KL10	<i>bla</i> <sub>SHV-11</sub>	-	-	-	+	-	-	-
11498	<i>K. pneumoniae</i>	ST1836	KL122	<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> ; <i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> ; <i>bla</i> <sub>SHV-11</sub>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>	-	+	-	-	-	-
11519	<i>K. pneumoniae</i>	ST2428	KL46	-	<i>bla</i> <sub>SHV-41</sub> *	-	-	+	-	-	-
11570	<i>K. pneumoniae</i>	ST3073	KL132	<i>bla</i> <sub>SHV-11</sub>	-	-	-	-	-	-	-
11571	<i>K. pneumoniae</i>	ST23-1LV	KL142	-	<i>bla</i> <sub>SHV-27</sub> *	-	-	-	-	-	-
11572	<i>K. oxytoca</i>	n.a.	KL27	<i>bla</i> <sub>OXY2-1</sub>	-	-	-	-	-	-	-
11648	<i>K. pneumoniae</i>	ST39	KL23	<i>bla</i> <sub>SHV-11</sub>	-	-	+	-	-	-	-
11649	<i>K. pneumoniae</i>	ST63-1LV	KL31	<i>bla</i> <sub>SHV-11</sub>	-	-	-	-	-	-	-
11650	<i>K. pneumoniae</i>	ST494	KL25	<i>bla</i> <sub>SHV-61</sub>	-	-	-	+	-	-	-

ID BfR	Speziesidentifikation WGS	Sequence type (MLST)	Kapsel-Typ	Resistenzgene			Virulenzfaktoren				
				Beta-Laktamase-Gene	ESBL-gene	Col	ybt	iuc	iro	clb	rmpA/rmpA2
11677	<i>K. variicola</i>	ST347	KL113	<i>bla</i> <sub>LEN-19</sub>	-	-	-	-	-	-	-
11678	<i>K. pneumoniae</i>	ST530	KL54	<i>bla</i> <sub>SHV-1</sub>	-	-	-	-	-	-	-
11699	<i>K. michiganensis</i>	n.a.	KL29	<i>bla</i> <sub>OXY1-4</sub>	-	-	-	-	-	-	-
11714	<i>K. pneumoniae</i>	ST322	KL17	<i>bla</i> <sub>SHV-11</sub>	-	-	-	-	-	-	-
11733	<i>K. pneumoniae</i>	ST464-1LV	KL114	-	<i>bla</i> <sub>SHV-27</sub> *	-	-	-	-	-	-
11890	<i>K. pneumoniae</i>	ST3377-1LV	KL31	<i>bla</i> <sub>SHV-11</sub>	-	-	-	-	-	-	-
30298	<i>K. pneumoniae</i>	ST20	KL38	<i>bla</i> <sub>SHV-187</sub>	-	-	-	-	-	-	-
30299	<i>K. pneumoniae</i>	ST541-1LV	KL30	<i>bla</i> <sub>SHV-11</sub>	-	-	+	-	-	-	-
30300	<i>K. pneumoniae</i>	ST159	KL3	<i>bla</i> <sub>SHV-11</sub>	-	-	-	-	-	-	-
30301	<i>K. pneumoniae</i>	ST485	KL6	-	<i>bla</i> <sub>SHV-27</sub> *	-	-	+	-	-	-
30327	<i>K. pneumoniae</i>	ST323	KL39	<i>bla</i> <sub>SHV-11</sub>	-	-	+	+	-	-	-
30499	<i>K. pneumoniae</i>	ST289	KL55	<i>bla</i> <sub>SHV-11</sub>	-	-	-	+	-	-	-
10037_2	<i>K. grimontii</i>	n.a.	KL26	<i>bla</i> <sub>OXY6-4</sub>	-	-	-	-	-	-	-
10038_2	<i>K. oxytoca</i>	n.a.	KL20	<i>bla</i> <sub>OXY2-1</sub>	-	-	-	-	-	-	-
10088_2	<i>K. pneumoniae</i>	ST132-2LV	KL46	<i>bla</i> <sub>SHV-168</sub>	-	-	-	-	-	-	-
10089_2	<i>K. pneumoniae</i>	ST323	KL61	<i>bla</i> <sub>SHV-11</sub>	-	-	-	-	-	-	-
10191_3	<i>K. grimontii</i>	n.a.	KL107	<i>bla</i> <sub>OXY6-4</sub>	-	-	-	-	-	-	-
10591_2	<i>K. variicola</i>	ST3526-1LV	KL31	<i>bla</i> <sub>LEN-16</sub>	-	-	-	-	-	-	-
10863_3	<i>K. pneumoniae</i>	ST661	KL28	-	<i>bla</i> <sub>SHV-27</sub> *	-	-	+	-	-	-
10975_2	<i>K. grimontii</i>	n.a.	KL68	<i>bla</i> <sub>OXY6-4</sub>	-	-	-	-	-	-	-
11315_2	<i>K. grimontii</i>	n.a.	KL74	<i>bla</i> <sub>OXY6-2</sub>	-	-	-	-	-	-	-
11316_2	<i>K. pneumoniae</i>	ST244-2LV	KL107	<i>bla</i> <sub>SHV-234</sub>	-	-	-	-	-	-	-
11322_2	<i>K. pneumoniae</i>	ST147	KL81	<i>bla</i> <sub>SHV-11</sub>	-	-	-	-	-	-	-
11560_2	<i>K. michiganensis</i>	n.a.	KL107	<i>bla</i> <sub>OXY1-5</sub>	-	-	-	-	-	-	-
11726_2	<i>K. pneumoniae</i>	ST4248	KL35	<i>bla</i> <sub>SHV-187</sub>	-	-	-	-	-	-	-
11744_2	<i>K. pneumoniae</i>	ST5-1LV	KL39	<i>bla</i> <sub>SHV-11</sub>	-	-	-	+	-	-	-
1482_2	<i>K. pneumoniae</i>	ST127	KL30	-	-	-	-	-	-	-	-
14EP03163	<i>K. pneumoniae</i>	ST188	KL31	<i>bla</i> <sub>SHV-37</sub>	-	-	-	-	-	-	-
1616_4	<i>K. pneumoniae</i>	ST2404-1LV	KL6	<i>bla</i> <sub>TEM-10</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV-211</sub>	-	-	-	-	-	-	-
2404_3	<i>K. michiganensis</i>	n.a.	KL74	<i>bla</i> <sub>OXY1-4</sub>	-	-	-	-	-	-	-
2486_3	<i>K. grimontii</i>	n.a.	KL161	<i>bla</i> <sub>OXY6-2</sub>	-	-	-	-	-	-	-
2513_3	<i>K. michiganensis</i>	n.a.	KL29	<i>bla</i> <sub>OXY1-4</sub>	-	-	-	-	-	-	-
30312_2	<i>K. pneumoniae</i>	ST153	KL3	<i>bla</i> <sub>SHV-11</sub>	-	-	+	+	-	-	-
3306_3	<i>K. pneumoniae</i>	ST5-1LV	KL39	<i>bla</i> <sub>SHV-11</sub>	-	-	-	+	-	-	-
3630_2	<i>K. pneumoniae</i>	ST107	KL10	<i>bla</i> <sub>SHV-11</sub>	-	-	-	-	-	-	-
4062_2	<i>K. pneumoniae</i>	ST107	KL10	<i>bla</i> <sub>SHV-11</sub>	-	-	-	-	-	-	-
4804_2	<i>K. pneumoniae</i>	ST991	KL30	<i>bla</i> <sub>SHV-1</sub>	-	-	-	-	-	-	-
4872_2	<i>K. pneumoniae</i>	ST1838	KL14	<i>bla</i> <sub>SHV-11</sub>	-	-	-	-	-	-	-
4886_2	<i>K. pneumoniae</i>	ST4247	KL14	<i>bla</i> <sub>SHV-11</sub>	-	-	-	-	-	-	-
4887_2	<i>K. pneumoniae</i>	ST2248	KL9	<i>bla</i> <sub>SHV-1</sub>	-	-	-	-	-	-	-

ID BfR	Speziesidentifikation WGS	Sequence type (MLST)	Kapsel-Typ	Resistenzgene			Virulenzfaktoren				
				Beta-Laktamase-Gene	ESBL-gene	Col	ybt	iuc	iro	clb	rmpA/rmpA2
4888_2	<i>K. variicola</i>	ST919-1LV	KL67	<i>bla</i> <sub>LEN-32</sub>	-	-	-	-	-	-	-
4889_2	<i>K. pneumoniae</i>	ST1996	KL128	-	<i>bla</i> <sub>SHV-41</sub> *	-	-	-	-	-	-
4890_2	<i>K. variicola</i>	ST3971	KL60	<i>bla</i> <sub>LEN-24</sub>	-	-	-	-	-	-	-
5451_2	<i>K. pneumoniae</i>	ST2451	KL30	<i>bla</i> <sub>SHV-1</sub>	-	-	-	-	-	-	-
5452_2	<i>K. pneumoniae</i>	ST200-2LV	KL142	<i>bla</i> <sub>SHV-157</sub>	-	-	-	-	-	-	-
5455_2	<i>K. pneumoniae</i>	ST2397-1LV	KL61	<i>bla</i> <sub>SHV-199</sub>	-	-	-	+	-	-	-
5456_2	<i>K. pneumoniae</i>	ST2397-1LV	KL61	<i>bla</i> <sub>SHV-199</sub>	-	-	-	+	-	-	-
5466_2	<i>K. grimontii</i>	n.a.	KL107	<i>bla</i> <sub>OXY6-3</sub>	-	-	-	-	-	-	-
5578_2	<i>K. pneumoniae</i>	ST45	KL24	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> ; <i>bla</i> <sub>SHV-1</sub>	-	-	+	+	-	-	-
5665_2	<i>K. pneumoniae</i>	ST301-3LV	KL116	-	<i>bla</i> <sub>SHV-27</sub> *	-	-	-	-	-	-
5667_2	<i>K. pneumoniae</i>	ST290	KL21	<i>bla</i> <sub>SHV-1</sub>	-	-	-	-	-	-	-
5695_2	<i>K. pneumoniae</i>	ST18	KL122	<i>bla</i> <sub>SHV-11</sub>	-	-	-	-	-	-	-
5901_5	<i>K. pneumoniae</i>	ST3839	KL6	-	<i>bla</i> <sub>SHV-27</sub> *	-	-	-	-	-	-
6675_2	<i>K. michiganensis</i>	n.a.	KL161	<i>bla</i> <sub>OXY1-1</sub>	-	-	-	-	-	-	-
7090_4	<i>K. pneumoniae</i>	ST2426	KL117	-	<i>bla</i> <sub>SHV-27</sub> *	-	-	-	-	-	-
753_2	<i>K. pneumoniae</i>	ST611	KL49	-	-	-	-	+	-	-	-
8162_2	<i>K. pneumoniae</i>	ST33	KL13	<i>bla</i> <sub>SHV-108</sub>	-	-	-	-	-	-	-
8534_2	<i>K. grimontii</i>	n.a.	KL26	<i>bla</i> <sub>OXY6-4</sub>	-	-	-	-	-	-	-
9653_2	<i>K. pneumoniae</i>	ST3380	KL107	-	<i>bla</i> <sub>SHV-27</sub> *	-	-	-	-	-	-
9732_2	<i>K. michiganensis</i>	n.a.	KL43	<i>bla</i> <sub>OXY1-1</sub>	-	-	-	-	-	-	-

**Tabelle A 3: Übersicht über Verfügbarkeit der Genomdaten der im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten *Klebsiella* spp.-Isolate von Lebensmitteln und Tieren.**

ID: BfR Isolatnummer, Die Sequenzen wurden auf GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) hinterlegt.

ID BfR	Zugangsnummern			
	SUBID	BioProject	BioSample	Accession
283	SUB2837345	PRJNA392785	SAMN07310305	NKTN00000000
1678	SUB2837346	PRJNA392784	SAMN07310306	NKTO00000000
1701	SUB2841441	PRJNA393148	SAMN07319187	NNBA00000000
10109	SUB2841445	PRJNA393147	SAMN07319188	NMOX00000000
11213	SUB2841448	PRJNA393146	SAMN07319179	NMOY00000000
11214	SUB2927695	PRJNA397424	SAMN07457095	NPON00000000
11250	SUB2841453	PRJNA393145	SAMN07319180	NNBB00000000
11251	SUB2841457	PRJNA393144	SAMN07319181	NMOZ00000000
11252	SUB2841465	PRJNA393141	SAMN07319176	NNBD00000000
11260	SUB2855057	PRJNA393546	SAMN07337321	NMWY00000000
11262	SUB2855060	PRJNA393547	SAMN07337322	NMWZ00000000
11263	SUB2855061	PRJNA393552	SAMN07337325	NMXA00000000
11264	SUB2855064	PRJNA393554	SAMN07337338	NMXB00000000
11265	SUB2855079	PRJNA393556	SAMN07337340	NMXC00000000
11269	SUB2855081	PRJNA393557	SAMN07337344	NMXD00000000
11324	SUB2855085	PRJNA393558	SAMN07337346	NMXE00000000
11331	SUB2855086	PRJNA393561	SAMN07337347	NMXF00000000
11332	SUB2855089	PRJNA393562	SAMN07337349	NMXG00000000
11333	SUB3272799	PRJNA420640	SAMN08116998	PIZW00000000
11390	SUB3273314	PRJNA420638	SAMN08116999	PIUC00000000
11425	SUB3541020	PRJNA431088	SAMN08383927	PPTB00000000
11463	SUB3273629	PRJNA420636	SAMN08117040	PIZX00000000
11486	SUB3274337	PRJNA420635	SAMN08117042	PIZY00000000
11487	SUB3397335	PRJNA427503	SAMN08238643	PKPI00000000
11496	SUB3397346	PRJNA427504	SAMN08238682	PKPJ00000000
11497	SUB3397360	PRJNA427506	SAMN08238683	PKPK00000000
11498	SUB4484862	PRJNA488924	SAMN09945374	QYYR00000000
11519	SUB3397369	PRJNA427507	SAMN08238684	PKPL00000000
11570	SUB4484861	PRJNA488923	SAMN09945370	QYYQ00000000
11571	SUB9026871	PRJNA699131	SAMN17766520	JAFKNY00000000
11572	SUB3397383	PRJNA427509	SAMN08238686	PKPM00000000
11648	SUB3397400	PRJNA427510	SAMN08238687	PKPN00000000
11649	SUB3397408	PRJNA427511	SAMN08238688	PKPO00000000
11650	SUB3541021	PRJNA431089	SAMN08383928	PPTC00000000
11677	SUB3541037	PRJNA431091	SAMN08383929	PPTD00000000
11678	SUB3541058	PRJNA431092	SAMN08383930	PPXI00000000
11699	SUB3725107	PRJNA435872	SAMN08605679	PUIJ00000000
11714	SUB3725112	PRJNA435874	SAMN08605681	PUIL00000000
11733	SUB3725115	PRJNA435876	SAMN08605717	PUIM00000000
11890	SUB4195136	PRJNA477576	SAMN09475209	QMFO00000000
30298	SUB4195157	PRJNA477578	SAMN09475212	QMFQ00000000
30299	SUB4195160	PRJNA477580	SAMN09475229	QMFR00000000
30300	SUB4195178	PRJNA477581	SAMN09475230	QMF500000000
30301	SUB4484842	PRJNA488914	SAMN09945360	QYYL00000000
30327	SUB4484845	PRJNA488915	SAMN09945361	QYYM00000000
30499	SUB2841436	PRJNA393152	SAMN07319189	NNBH00000000
10037_2	SUB2841437	PRJNA393151	SAMN07319184	NMOU00000000
10038_2	SUB2841439	PRJNA393150	SAMN07319185	NMOV00000000
10088_2	SUB2841440	PRJNA393149	SAMN07319186	NMOW00000000
10089_2	SUB3765968	PRJNA437644	SAMN08678882	PXNV00000000
10191_3	SUB3812369	PRJNA439424	SAMN08765747	PYIP00000000
10591_2	SUB3812374	PRJNA439425	SAMN08765749	PYIQ00000000
10863_3	SUB3733707	PRJNA436161	SAMN08618355	PVWW00000000
10975_2	SUB6300507	PRJNA565746	SAMN12766949	VYHY00000000
11315_2	SUB3271090	PRJNA420742	SAMN08116986	PIZZ00000000
11316_2	SUB3271621	PRJNA420655	SAMN08116996	PIUI00000000
11322_2	SUB4195118	PRJNA477562	SAMN09475183	QNRD00000000
11560_2	SUB3725111	PRJNA435873	SAMN08605680	PUIK00000000
11726_2	SUB4195156	PRJNA477577	SAMN09475210	QMFP00000000

ID BfR	Zugangsnummern			
	SUBID	BioProject	BioSample	Accession
11744_2	SUB6300473	PRJNA565742	SAMN12766867	VYHW00000000
1482_2	SUB3725106	PRJNA435871	SAMN08605678	PUII00000000
14EP03163	SUB3765955	PRJNA437626	SAMN08668685	PXJJ00000000
1616_4	SUB2837347	PRJNA392783	SAMN07310307	NKTP00000000
2404_3	SUB2837348	PRJNA392782	SAMN07310301	NKTQ00000000
2486_3	SUB2837349	PRJNA392781	SAMN07310302	NKTR00000000
2513_3	SUB4484849	PRJNA488917	SAMN09945363	QYYO00000000
30312_2	SUB3765957	PRJNA437632	SAMN08668857	PXJK00000000
3306_3	SUB2898961	PRJNA395964	SAMN07418585	NOWR00000000
3630_2	SUB4484863	PRJNA488925	SAMN09945375	QYYS00000000
4062_2	SUB2837351	PRJNA392780	SAMN07310303	NKTS00000000
4804_2	SUB2837352	PRJNA392779	SAMN07310298	NKTT00000000
4872_2	SUB2837354	PRJNA392778	SAMN07310299	NKTU00000000
4886_2	SUB2837355	PRJNA392777	SAMN07310300	NKTV00000000
4887_2	SUB2838574	PRJNA392871	SAMN07311764	NKTW00000000
4888_2	SUB2841406	PRJNA393139	SAMN07319178	NMOT00000000
4889_2	SUB2841408	PRJNA393163	SAMN07319198	NNBE00000000
4890_2	SUB2899088	PRJNA395965	SAMN07418586	NOWQ00000000
5451_2	SUB6300485	PRJNA565745	SAMN12766886	VYHX00000000
5452_2	SUB3144008	PRJNA415117	SAMN07816296	PEAS00000000
5455_2	SUB3144017	PRJNA415118	SAMN07816297	PEAT00000000
5456_2	SUB3268657	PRJNA420746	SAMN08116963	PJAM00000000
5466_2	SUB2841410	PRJNA393162	SAMN07319199	NMPC00000000
5578_2	SUB2841411	PRJNA393161	SAMN07319200	NMPD00000000
5665_2	SUB2841413	PRJNA393160	SAMN07319193	NMPE00000000
5667_2	SUB2841415	PRJNA393159	SAMN07319194	NMPF00000000
5695_2	SUB2841419	PRJNA393158	SAMN07319195	NMPG00000000
5901_5	SUB2841422	PRJNA393157	SAMN07319196	NNBF00000000
6675_2	SUB2841423	PRJNA393156	SAMN07319197	NMPH00000000
7090_4	SUB4484866	PRJNA488926	SAMN09945377	QYYT00000000
753_2	SUB2841427	PRJNA393155	SAMN07319190	NMPI00000000
8162_2	SUB3270824	PRJNA420745	SAMN08116966	PJAN00000000
8534_2	SUB3270967	PRJNA420743	SAMN08116968	PIUH00000000
9653_2	SUB2841433	PRJNA393153	SAMN07319192	NNBG00000000
9732_2	SUB2841433	PRJNA393153	SAMN07319192	NNBG00000000



**Tabelle A 4: Übersicht über die aus Genomdaten identifizierten Eigenschaften, der im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten *K. pneumoniae*-Isolate.**

ID: RKI Isolatnummer; MLST: *multilocus sequence typing*; ESBL: *extended-spectrum beta-lactamase*; *ybt*: Yersiniabactin; *iro*: Salmochelin; *iuc*: Aerobactin, *clb*: Colibactin; *rmpA/rmpA2*: Regulator des mukoiden Phänotyps; n.a.: nicht angegeben

ID	Sequence type (MLST)	Kapseltyp	Untersuchungsmaterial	Beta-Laktamase-Gene			ESBL-Gene	Carbapenemase-Gene	Virulenzfaktoren						Zugangsnummer NCBI
				<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	<i>bla</i> <sub>OXA</sub>			<i>ybt</i>	<i>iro</i>	<i>iuc</i>	<i>clb</i>	<i>rmpA</i>	<i>rmpA2</i>	
09-0219	23	KL1	n.a.	11	-	-	-	<i>bla</i> <sub>VIM-1</sub>	+	+	+	+	+	-	-
14-0574	23	KL57	n.a.	1	-	1	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	+	-	+	-	+	+	SAMN05412805
15-0312	395	KL2	Peritonealabstrich	11	1	1	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	+	-	+	-	-	+	SAMEA29230168
15-0316	23	KL1	Trachealsekret	11	1	1	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	+	+	+	+	+	+	SAMEA29232418
15-0318	395	KL2	bronchoalveoläre Lavage	11	1	1	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	+	-	+	-	-	+	SAMEA29233918
17-0609	2398	KL2	Leberabzess	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	SAMEA79703668
17-0736	5	KL39	Blutkultur	11	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-
18-0005	66	KL2	Rachenabstrich	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	SAMN16809114
18-0030	310	KL1	Mastitisisolat Rind	116	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18-0169	307	KL102	n.a.	28	1	1	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	+	-	+	-	-	+	-
18-0256	23	KL57	n.a.	1	-	1;2	<i>bla</i> <sub>CTX-M-55</sub>	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	+	-	+	-	+	+	-
18-0260	23	KL1	n.a.	11	-	9	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>	<i>bla</i> <sub>NDM-1</sub>	+	+	+	+	-	+	-
18-0263	23	KL58	n.a.	1	-	1	<i>bla</i> <sub>CTX-M-55</sub>	<i>bla</i> <sub>OXA-244</sub>	+	-	+	-	+	+	-
18-0408	147	KL64	n.a.	11	-	-	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>	<i>bla</i> <sub>NDM-1</sub>	+	-	+	-	+	+	-
18-0414	392	KL27	n.a.	11	1	1	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	+	-	-	-	-	+	-
18-0430	147	KL64	n.a.	11	-	-	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>	<i>bla</i> <sub>NDM-1</sub>	+	-	+	-	+	+	-
18-0431	17	KL25	n.a.	-	-	-	-	<i>bla</i> <sub>NDM-1</sub>	-	-	+	-	+	+	-
18-0439	23	KL1	n.a.	11	1	1	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	+	+	+	+	+	+	-
18-0600	380	KL2	n.a.	207	-	-	<i>bla</i> <sub>CTX-M-27</sub>	-	+	+	+	+	+	-	-
18-0637	893	KL20	Wundabsrich	1	-	-	<i>bla</i> <sub>CTX-M-14</sub>	-	+	+	+	-	+	+	-
19-0036	412	KL57	Blutkultur	1	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-
19-0213	23	KL57	Leberabzess	1	-	1	<i>bla</i> <sub>CTX-M-55</sub>	<i>bla</i> <sub>NDM-1</sub> ; <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	+	-	+	-	+	+	-
NCTC14052	23	KL1	Leberabzess	11	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	SAMN06112188
16-0382	15	KL24	Urin	28	-	1	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>	-	+	-	-	-	-	-	-
16-0383	29	KL30	Rachenabstrich	187	1	1	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-
17-0683	1754	KL62	Blutkultur	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17-0684	889	KL54	Blutkultur	108	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
PEI-B-P-09	48	KL62	Thrombozytenkonzentrat	11	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	SAMEA4470457
ATCC700721	38	KL15	Sputum	11	1	9	-	-	-	-	-	-	-	-	SAMN02603941

## Danksagung

Allen voran gilt mein Dank Prof. Dr. Guido Werner für die Möglichkeit meine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe anfertigen zu können. Darüber hinaus möchte ich ihm für seine fachliche Betreuung und die Förderung meiner eigenen Ideen danken.

Mein Dank gilt außerdem den Gutachtern dieser Arbeit, Prof. Dr. Michael Steinert und Prof. Dr. Michael Hust, für ihre Bereitschaft als Teil der Prüfungskommission das Promotionsverfahren zu begleiten.

In besonderem Maße möchte ich Dr. Roman Gerlach für seine Betreuung, seine fortwährende Unterstützung und Diskussionsbereitschaft sowie für sein immer offenes Ohr danken. Vielen Dank für deine Geduld, Zeit und Hilfe!

Dr. Yvonne Pfeifer und Dr. Stephan Fuchs danke ich ganz herzlich für ihre ausgesprochene Hilfsbereitschaft, kollegiale Unterstützung sowie das Interesse am Fortlauf der Arbeit als auch die angenehme und produktive Zusammenarbeit.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Kooperationspartnern vom Uniklinikum Leipzig, am BfR Berlin und CVUA Stuttgart, für die freundliche und produktive Zusammenarbeit. Danke an die Arbeitsgruppe von Priv.-Doz. Dr. med. Isabelle Bekeredjian-Ding für die freundliche Aufnahme, die entgegengebrachte Hilfe sowie für die produktiven und lustigen Tage am Paul-Ehrlich-Institut.

Christiane Schmidt, Kirstin Ganske und Sibylle Müller-Bertling danke ich für die technische Unterstützung und Hilfe sowie die vielen netten Stunden im Labor.

Ein herzlicher Dank gilt meinen Kollegen und mittlerweile Freunden Bernd, Chris, Franzi, Jenni, Lena, Manuella, Mareike, Nancy und Sabrina. Mit euch durfte ich 3 wundervolle und abenteuerreiche Jahre in Wernigerode verbringen.

Abschließend danke ich meiner Familie, insbesondere meinem Mann Matthias, von Herzen für ihre Liebe, und Geduld. Ohne euch wäre das erfolgreiche Abschließen dieser Arbeit so nicht möglich gewesen.